

## PATENT

Docket No. 10235-4

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventors : Yoshihiro SATO  
Serial No. : (Nat'l. Phase of PCT/JP98/02389)  
Filed : 19 February 1999  
For : METHOD FOR RETAINING MINUTE DROPLET,  
REACTING AND REACTION VESSEL

ASSISTANT COMMISSIONER  
FOR PATENTS  
Washington, D.C. 20231

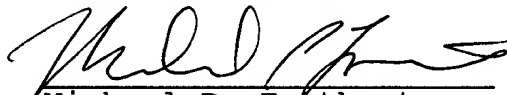
CLAIM TO CONVENTION PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

SIR:

Applicants hereby claim the Convention Priority Date of  
Japanese Patent Application No. 177857/1997 filed in Japan on  
19 June 1997. A certified copy of said Japanese Patent  
Application has been submitted in the International phase.

Respectfully submitted,

Dated: 19 February 1999

  
Michael P. Fortkort  
(Reg. No. 35,141)

KENYON & KENYON  
1025 Connecticut Ave., N.W.  
Washington, DC 20036

Tel: (202) 429-1776  
Fax: (202) 429-0796

183441\10235/4

29.05.98

日本国特許庁 09/242561

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 17 JUL 1998

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年 6月19日

出願番号  
Application Number:

平成 9年特許願第177857号

出願人  
Applicant(s):

トヨタ自動車株式会社

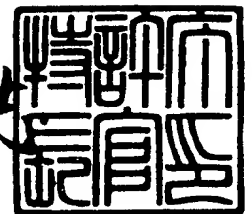
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1998年 7月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山佐 建志



出証番号 出証特平10-3052396

【書類名】 特許願

【整理番号】 P97-0208

【提出日】 平成 9年 6月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 31/22  
C07K 1/02

【発明の名称】 微小液滴の保持方法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

【氏名】 佐藤 至弘

【特許出願人】

【識別番号】 000003207

【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微小液滴の保持方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板上に微小液滴を保持する方法であって、前記微小液滴を前記基板表面に被覆された前記微小液滴と2相に分離する液体層中で前記基板表面に接触させて保持することを特徴とする微小液滴の保持方法。

【請求項2】 前記微小液滴は水性であり、前記基板表面に被覆された液体層は油性であることを特徴とする請求項1記載の微小液滴の保持方法。

【請求項3】 前記微小液滴を、前記基板表面に被覆された液体層の表面から打ち込むことを特徴とする請求項1又は2記載の微小液滴の保持方法。

【請求項4】 前記基板表面は撥水性を有することを特徴とする請求項1、2又は3記載の微小液滴の保持方法。

【請求項5】 前記液体層表面をカバーで覆うことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の微小液滴の保持方法。

【請求項6】 前記微小液滴の近くの前記液体層中に他の水性液体を保持することを特徴とする請求項5記載の微小液滴の保持方法。

【請求項7】 前記微小液滴は前記カバーにも接触していることを特徴とする請求項5又は6記載の微小液滴の保持方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学反応などに用いられる極微量の溶液をガラスプレート表面などに安定に保持する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、バイオテクノロジーの分野では、PCR (polymerase chain reaction) やEIA (enzyme immunoassay) などの反応が利用されている。これらの反応においては、コスト削減などの観点から、反応液量の微量化が重要である。紙にインクを付着させて文字や画像を可視化するインクジェットの技術は、もともと

は印刷のために開発されたものではあるが、極微量の液体を正確かつ高速に分注可能であり、反応液量の微量化のための技術として応用が図られてきた。

【0003】

米国特許第4, 877, 745号明細書及び BioTechniques<sup>15</sup>, 324(1993) にはインクジェット技術の分注器としての利用法が記載され、米国特許第5, 449, 754号明細書及び米国特許第5, 474, 796号明細書にはインクジェット技術の有機化学合成への応用が記載され、特開平4-262256号公報及び Analytical Chemistry <sup>67</sup>, 3051にはインクジェット技術の免疫学的反応への応用が記載されている。例えば、特開平4-262256号公報には、必要な試薬をインクジェットによってフィルム上に印刷しておき、使用時に50 $\mu$ l程度のサンプル溶液を加え、試薬を溶出させて反応を行い、洗浄、発色を経て検出する方法が記載されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

このように、化学反応における反応溶液の分注器としてインクジェットを利用することが考えられているが、臨床検査などで多数の反応を並列的に行う場合、試薬コスト低減のため個々の液量はできるだけ少ない方が望ましく、例えば100nl以下とするのが望ましい。しかし、これまでインクジェットを利用して100nl以下、例えば10nl $\sim$ 1pl程度の極微量の液中で臨床検査の反応、例えばPCRや免疫学的反応を行った例は報告されていない。前記した特開平4-262256号公報の例では、反応時の液量は50 $\mu$ lであり、極微量とはいえない。

【0005】

インクジェットを用いて極微量の反応を行った例がこれまで報告されていない理由の一つは、インクジェットで分注した極微量の水溶液は、空気中では数秒程度で蒸発してしまうからである。米国特許第5, 449, 754号明細書におけるように一瞬で完了する有機化学反応では極微量の反応例が報告されているが、通常の臨床検査の反応には数分から数時間の時間がかかり、その間反応液を蒸発させずに空気中に保持しておくのは困難である。

## 【0006】

また、極微量の反応をするために不可欠というわけではないが、蛍光法、比色法などにより反応の有無を検出するとき、反応液が極微量では通常の液量の場合と比べて光路長が著しく短くなり、検出が困難になる。従って、測定の際の光路長を長くするための工夫が必要である。

## 【0007】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みてなされたもので、化学反応などのために例えばインクジェット法によって吐出された極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持する方法を提供することを目的とする。

## 【0008】

また、本発明は、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液に対する光学的検出を容易にするため、光路長を増大させる方法を提供することを目的とする。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明では、例えばガラス平板などの基板上に、保持したい極微量の溶液（微小液滴）と混合しにくいオイルなどの液体層を形成し、その液体層中で微小液滴を基板表面に接触させて保持することで前記目的を達成する。微小液滴が水性のとき、基板表面に被覆される液体層は油性とすることができる。また、微小液滴は、基板表面に被覆された液体層の表面からインクジェット技術などにより打ち込むことができる。

## 【0010】

基板上に形成する液体層の粘度や膜厚を適当に選択することにより、液体層の表面から打ち込まれた微小液滴は基板表面に付着し、液体層の内部に隠れた状態で安定に保持される。微小液滴は、それと混合しない液体により周囲を覆われているため、蒸発を大幅に減少することができる。また、基板表面に付着して保持されていて位置が固定されているため、この状態でインクジェット技術によってさらに試薬を追加することも可能である。

## 【0011】

例えば、インクジェット法によって液体層に打ち込む微小液滴の量が40 p l のとき、液体層の最適粘度は20~50 c p、最適膜厚は20~30  $\mu$  mである。基板表面に被覆する液体層の膜厚が薄すぎると、微小液滴はその一部分が液体層から露出し、蒸発してしまう。また、液体層の膜厚が厚すぎると、微小液滴は液体層中を浮遊して位置が定まらないため、試薬の追加などが困難になる。

## 【0012】

基板表面に撥水性をもたせることもできる。ここで撥水性とは、基板表面に付着した液滴において、基板表面に対する液滴の立ち上がり角度（接触角）の大きさを表現されるもので、接触角が大きいほど撥水効果が高い。また、本発明においては、通常使用されるガラス基板に付着した液滴の接触角に対して、より大きい接触角を有する基板表面について撥水性を有すると表現する。この撥水性は、基板自体をポリプロピレンなどの撥水性を有する材料で作製することで付与してもよいし、基板上に撥水性材料をコーティングすることで付与してもよい。

## 【0013】

基板表面が撥水性を有していると、基板表面に付着した水性の微小液滴は基板との接触面積が小さくなって液体層の膜厚方向に立ち上がる。従って、微小液滴中で生じる化学反応を基板に垂直な方向から蛍光法や比色法などの光学的方法によって検出するとき、光路長が増大するため検出が容易になる。この場合、撥水性を有する基板あるいは撥水性コーティングは、微小液滴の光学測定に影響を与えるものではないことが必要である。

## 【0014】

基板を覆っている液体層中に微小液滴を打ち込んで基板表面に微小液滴を保持したのち、液体層の上に透明なスライドグラス等のカバーをかけるようにすると、加熱の際に生じる対流などによって液体層の液面が乱れるのを防止し、微小液滴が液体層から露出して蒸発するのを防止することができる。カバーをかけるに先立って、液体層に液体を補充してもよい。

## 【0015】

また、液体層中に打ち込んだ微小液滴の近くの液体層中に他の水性液体を配置することも微小液滴を安定に保持する上で有効である。液体層中に保持されてい

る微小液滴は、反応過程で加熱した際などに周囲の液体に溶出して体積が減少する傾向がある。反応を行う水性の微小液滴のすぐ近くに他の水滴を配置すると、微小液滴の近くの液体層の局所的水分含有量を大きくすることができ、反応を行う微小液滴の溶出防止に効果がある。溶出防止用の水滴の代わりに、反応を行う微小液滴を密集して配置することでも同様の溶出緩和効果が得られる。

【0016】

さらに、光学的測定のための光路長増大の点からは、微小液滴を液体層の上に配置した透明カバーにも接触させるのが望ましい。これは、基板とカバーとの間隔を狭めて微小水滴を一度カバーに接触させ、そののち基板とカバーの間隔を再び広げることにより実現できる。そのためには、基板とカバーとの間のスペーサとして弾性のある部材を用いるのが好ましい。基板とカバーの間隔を狭める動作は、最も簡単には指でカバーを押圧することによって行うことができるが、精密モータや圧電素子を用いてカバーを基板側に押圧することで行ってもよい。このように微小液滴を基板表面とカバー底面の両方に接触させて保持することにより、微小液滴内の基板垂直方向の光路長を増大することができるとともに、光路長を一定にすることが可能となり、測定の精度及び信頼性を向上することができる。

本発明は、PCR法、イムノアッセイ等の微量試料の反応に適用することができる。

【0017】

#### 【発明の実施の形態】

以下、図面を用いて本発明の実施の形態を説明する。

#### 【実施の形態1】

ここでは、微小液滴を保持する基板として顕微鏡観察用のカバーガラスを、微小液滴として水滴を、基板表面に被覆する微小液滴と混合しにくい液体としてオイルを用い、カバーガラス表面を被覆している油膜の中にインクジェットノズルから水滴を打ち込んで、水滴が基板表面に安定に保持される条件を探索した。

【0018】

図1は、油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから水滴が打ち



込まれる様子を模式的に示した図である。スライドガラス10の表面には油膜11が塗布されている。インクジェットノズル12から所定の速度で吐出された水滴13は、スライドガラス10の上方からその表面を被覆する油膜11中に打ち込まれる。油膜11中に打ち込まれた水滴13は、図2に示すように、水滴13の全体が油膜11の内部に隠れ、なおかつスライドガラス10の表面に付着した状態にする。この状態で、水滴13は油膜11に保護され、蒸発することなく長時間安定に保持される。また、スライドガラス10の表面に付着しているため、水滴13の位置的安定性も確保される。

#### 【0019】

基板10に塗布する油膜11の粘度、膜厚は、打ち込む水滴13の量、速度によって最適な値の範囲が決まる。油膜11の粘度、膜厚が不適切であると、図3(a)のように水滴14が油膜11の上部に露出して空気に触れ、蒸発してしまう。あるいは、図3(b)のように水滴15が油膜11の内部に浮いてしまう。油膜中に浮遊した水滴15は、やがては油膜と空気のと境界に到達し、蒸発してしまう可能性が高い。

#### 【0020】

水滴を多く分注すると、図3(c)のような状態になることが多い。これは、油膜11の内部に水滴16が入ったものの、油膜11の表面がくぼんでいる状態である。オイルの粘度が不適切な場合、図3(c)の状態からすぐに図3(a)のような状態に移り、水滴の表面から油膜がなくなって、やがて蒸発してしまう。しかし、オイルの粘度が適切な場合、水滴の表面に油膜はしばらく保持される。この場合には、図3(c)の状態の時にさらにオイルを加えることで、図2のような状態にもっていくことができる。

#### 【0021】

次に、具体的な例について説明する。微小液滴を吐出するために、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタMJ-500Cを実験に使用した。モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、吐出させた。プリンタの制御は、パーソナルコンピュータ(NEC製、PC9801ns)でコントロールコード「EPSON ESC/P

J84」のイメージ処理機能を使用して行った。

【0022】

このときの縦方向、横方向のドット密度はいずれも360ドット/インチであった。このプリンタの解像度はセミ720dpi (720dpi×720dpiで、隣接するドットは印刷しない) であるので、1ドットは実際には2滴からなると思われる。超純水を98304ドット吐出したとき、全体の液量は4.0μlであったので、1ドットあたりの液量は約40plである。

【0023】

水滴を付着させる基板としては、顕微鏡観察用カバーガラス(マツナミ製、18mm×18mm、厚さ0.12~0.17mm)を使用した。このカバーガラスをプリンタにセットするため、図4に示すような台紙を使用した。台紙20は、コピー用紙又はオーバーヘッドプロジェクタ用の透明シートで作り、図中に斜線で示した左下の10mm×10mmの部分21を観察用にくり抜いたものである。この台紙のくり抜かれた部分を含む18mm×18mmの部分22に両面テープ(ニチバン製セルタックCW-18)でカバーガラスを裏側から接着した。

【0024】

カバーガラスを接着した台紙をプリンタにセットし、カバーガラス上に後述するオイルからなる油膜を塗布した。油膜を塗布する範囲は、カバーガラスの中央部10mm×10mmの台紙がくり抜かれた部分21である。マイクロピペットで一定量(1μl~5μl)のオイルをカバーガラス上においたあと、ピペットの先端で10mm×10mmの範囲に均等に塗布した。

【0025】

油膜を塗布したあと、プリンタで水滴を打ち込んだ。水滴の打ち込みパターンは図5に示したとおりであり、1ドットの水滴25を8/360インチ(0.56mm)の間隔で、縦横それぞれ4つずつ、計16カ所に打ち込んだ。

【0026】

顕微鏡(オリンパス光学工業製倒立型顕微鏡1MT-2)で観察すると、打ち込まれた水滴の保持に成功した場合には、水滴が油膜の底でカバーガラスに付着し、水滴全体が油膜の内部に隠れた状態になる。この状態を模式的に表すと図2

のようになる。このとき、水滴は直径約 $100\mu\text{m}$ で、ほぼ円形に観察された。

【0027】

打ち込まれた水滴の保持に失敗した場合には、図6のように、油膜11がとぎれてカバーガラス10の表面がむき出しになって観察されることがある。これは、図3(a)の状態から水滴が蒸発したものと考えられる。また、観察される水滴の大きさが異常に小さい(直径 $50\mu\text{m}$ 以下)ことがある。これは、図3(a)の状態からある程度水滴が蒸発した後、図2に示す正常な保持状態になったためと思われる。水滴が実際にこのようにして蒸発していく様子を時には顕微鏡下で観察できることもある。このようなタイプの失敗は、主として油膜が薄すぎる場合に起こる。

【0028】

また、図3(b)に示すように、水滴が油膜中に浮遊しているのが観察される場合もある。あるいは、図7のように、離れた場所に2つの水滴32, 33が観察されることもある。これは、1ドットが2滴からできているため、2つの水滴が油膜11中を漂ったのち、別々の場所でカバーガラス10に付着したためと思われる。このようなタイプの失敗は、主として油膜11が厚すぎる場合に起こる。

【0029】

最適な油膜の条件を検討するため、オイルの種類、及び膜厚を変えて図5のようなパターンで水滴を打ち込む実験を3回行い、水滴が正常な状態で保持される割合、すなわち図2に示したように、水滴13の全体が油膜11の内部に隠れ、なおかつスライドガラス10の表面に付着した状態になる割合を調べた。結果を表1に示す。表中の数字は、水滴打ち込みの成功率(%)を表す。また、オイルとしては以下のものを使用した。

【0030】

A: シグマ社製ミネラルオイルM5904 (粘度 $20\text{cP}$ )

B: 信越化学工業(株)製シリコンオイルKF96-30 (粘度 $30\text{cP}$ )

C: 上記Bと下記Eを1:1の割合で混合したオイル

D: ベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246 (粘度 $40\text{cP}$ )

E：信越化学工業（株）製シリコンオイルKF96-50（粘度50cp）

F：昭和石油製粘度計校正用標準液（粘度50cp）

G：昭和石油製粘度計校正用標準液（粘度100cp）

H：昭和石油製粘度計校正用標準液（粘度200cp）

【0031】

【表1】

オイル の種類	塗布したオイルの量（ $\mu$ l）				
	1	2	3	4	5
A	42	65	58	27	0
B	100	100	58	23	6
C	100	100	96	77	0
D	100	100	85	38	0
E	94	98	79	27	0
F	6	54	10	0	0
G	10	48	27	2	0
H	0	15	27	17	0

【0032】

表1より、ここでの実験条件に対して最適なオイルの粘度は30～40cp、オイルの量は1～2 $\mu$ l（油膜の厚さに換算して10～20 $\mu$ m）であることがわかる。

【0033】

〔実施の形態2〕

実施の形態1で説明したように、微小液滴を保持する基板上に油膜を塗布し、その油膜内部に微小液滴を保持することにより、空気中への水滴の急速な蒸発を防止することができる。しかし、これだけでは極微量の反応を行うのに充分とはいえない。通常、オイルは一定の水分を含有することができる。例えば、シリコンオイルの場合、含有できる水分は100～200ppmである。そのため、油膜中に長時間極微量水滴を放置したり、反応を促進するために加熱したりすると

、微小液滴中の水分が周囲の油層に溶出し、蒸発したのと同じ状態になってしまう。

【0034】

水滴の油層への溶出を防止するための効果的な方法としては、図8(a)のように、実際に化学反応を行う水滴40のまわりに保護用の水滴41を配置すればよい。このように配置すると、反応用水滴40の油層への溶出速度が遅くなる。これは、反応用水滴40付近のオイルの水分含量が保護用水滴41によって局所的に上昇するためと考えられる。

【0035】

保護用水滴41の組成は何でもよく、ただの蒸留水でもよい。反応用水滴40は高価な試薬を含むため、量を増やすとコストがかかることになるが、保護用水滴41は安価なため量を増やしてもコストは無視できる。したがって、保護用水滴41は、必要なだけ量を多くすることができる。保護用水滴41は、反応用水滴40のまわりにたくさんあればよく、例えば図8(b)に示すように反応用水滴40を包囲して配置するなど種々の配置が考えられる。保護用水滴41を使用する代わりに、図8(c)に示すように、反応用水滴40同士を互いに密集させて配置しても同様に反応用水滴の油層への溶出速度を緩和する効果が得られる。

【0036】

次に、保護用水滴を配置することの効果についてより詳細に説明する。実施の形態1と同様に、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタMJ-500Cを用い、モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス(18mm×18mm、厚さ0.12~0.17mm)を実施の形態1と同様に、図4に示す台紙にセットしてその上に超純水を打ち出した。カバーガラスに塗布したオイルはシグマ社のミネラルオイルM5904、量は3 $\mu$ lである。打ち出しパターンは図5と同じであるが、重ね打ちを10回行った。そののちオイルをさらに20 $\mu$ l追加し、顕微鏡で観察したところ、16カ所の水滴全てが同じように直径240 $\mu$ m程度の円形に見えた。

【0037】

その後、図9に示すように、コの字形に切った両面シール（宝酒造製、in situ PCR用シール、厚さ約 $150\mu\text{m}$ ）45をカバーガラス10の端の方に貼り合わせ、この上からさらにもう一枚カバーガラスを貼り合わせた。図中、ハッチングを施した部分46は、油膜のある領域を指す。そして、シールのない部分47をマニキュアで固めて、密閉した。

#### 【0038】

こうして作製した反応容器を図4に示した台紙から剥がし、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社製DNAサーマルサイクラー480）のヒートブロック上に載せ、 $94^{\circ}\text{C}$  1分、 $55^{\circ}\text{C}$  1分、 $72^{\circ}\text{C}$  1分の温度サイクルを24回繰り返したのち、水滴の状態を顕微鏡で観察した。図10は、隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真である。図の左側が中央部の方向である。左側、すなわち中央部の水滴の方が盛り上がっているように見え、水滴の量が多いことが分かる。ピントがぼけて黒く点々と見えるのはカバーガラスに挟み込んだ内部に付着した水滴であり、この水滴も中央部の方が多い。このように、全部で16カ所ある水滴のうち、周辺部にある12カ所の水滴は、中央部の4カ所の水滴と比べて量が少なくなっていた。これは、中央部の水滴に対して、周辺部の12の水滴が前述の保護用水滴の役割を果たしたためと考えられる。

#### 【0039】

次に、前記と同様にして超純水をカバーガラス上に打ち出した。ただし、塗布したオイルの量は $2\mu\text{l}$ 、重ね打ち回数は2回である。打ち終わったあと、 $2\mu\text{l}$ のオイルを追加し、カバーをかけずにそのままサーマルサイクラーのヒートブロック上に載せ、前記と同様の温度サイクルを開始した。すると、最初に $94^{\circ}\text{C}$ に温度が上昇した時点で油膜の液面が乱れ、水滴が空気中に露出し、蒸発してしまった。このことから、油膜の上面にカバーをかけるのが有効であることが分かる。

#### 【0040】

##### 〔実施の形態3〕

極微量の水滴中で進行した反応を検出する方法としては、水滴の吸光度、蛍光、発光等の光学的変化を測定する方法が最も有力である。この場合、図11（a

）に示すように、水滴の付着している基板10の表面と油膜11の上面にかけるカバー50に透明な材料を使用し、これらと垂直な方向から励起光の照射、蛍光、発光、透過光の観察を行うのが合理的である。ところが、一般的な光学セルなどを使用する場合と比べて、光路長が短く、しかも一定しないため、定量的な観察をしにくいという問題がある。

#### 【0041】

そこで、この問題の解決策として、図11（b）に示すように、水滴が付着している基板10の表面と油膜11の上面に設置したカバー50との間隔を一旦狭めて水滴13をカバー50に接触させ、そののち再び図11（c）に示すように間隔を広げる方法を採用した。これによって、水滴13が基板表面と垂直な方向に引き延ばされ、水滴13中の光路長を最初より長く、しかも一定にすることができる。

#### 【0042】

カバー50と基板10の表面の間隔を調整する機構として、最も単純な方法は、図12（a）に断面を略示するカバー50、基板10、基板とカバーとの間隔を規制するスペーサ52、53等に弾性のある部材を使用し、図12（b）に示すようにカバーに基板表面との間隔を狭めるような力を加える方法である。この力は指で加えてもよいが、精密モータや圧電素子などを使用して力を加えてもよい。

#### 【0043】

次に、微小液滴を基板表面とカバーガラスの両方に接触させて光路長を増大したことによる効果について、より具体的に説明する。パーキンエルマー社の「TAQMAN PCR試薬キット」を用いて溶液を調整した。まず、キットの説明書に従って、次の〔表2〕のように試薬を混合した。

#### 【0044】

〔表2〕

試薬	最終濃度
KC1	50 mM
Tris-HCl, pH 8.3	10 mM

MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dUTP	400 μM
β-アクチンフォワードプライマー	300 nM

(下記配列表1参照)

β-アクチンリバースプライマー	300 nM
-----------------	--------

(下記配列表2参照)

β-アクチンプローブ	200 nM
------------	--------

(下記配列表3参照)

AmpliTaq DNAポリメラーゼ	0.25 U/μl
AmpErase UNG	0.01 U/μl
ヒト男性DNA	0.2 ng/μl

(ヒト男性DNAは、入っているものと入っていないものの2種類を調製した)

【0045】

配列表1

5' - TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA - 3'

配列表2

5' - CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG - 3'

配列表3

5' - (FAM) ATGCCC-X (TAMRA) CCCCCATGCCAT  
CCTGCGTp - 3'

ただし、Xはリンカー部がついているヌクレオチド、pはリン酸化を示す。FAM, TAMRAは蛍光色素名である。

【0046】

ヒト男性DNAが入っているもの(+)、入っていないもの(-)各300 μlを調製し、それぞれ6本のチューブに50 μlずつ分割した。これをサーマルサイクラに入れ、50℃1分、95℃1分のあと、92℃1分、54℃1分、7



2℃ 2分の温度サイクルを40サイクル繰り返し、さらに72℃で10分間反応させた。

【0047】

反応終了後、(+)と(-)の溶液をそれぞれ1本のチューブに集めた。(+)と(-)の溶液それぞれ10 $\mu$ lをTE緩衝液(10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA pH 8.0)990 $\mu$ lに加え、蛍光分光光度計(日本分光工業製、FP-777)で蛍光スペクトルを測定した。

結果を図13に示す。励起波長は488nmである。ヒト男性DNAの入っているサンプル(+)は、入っていないサンプル(-)と比べて、520nm付近の蛍光強度が強くなっている。

【0048】

(+)と(-)の溶液をそれぞれ別のモノクロ用プリンタヘッドに充填し、実施の形態1と同様にしてカバーガラス上に打ち出した。カバーガラス上に塗布したオイルはベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246で、使用量は2 $\mu$ lである。打ち出したドットパターンは、縦2ドット×横2ドットの4ドットで5回重ね打ちを行った。(+)のドット群と(-)のドット群は、互いに約0.7mm離して同一のカバーガラス上に打ち出した。

【0049】

(+)の溶液と(-)の溶液を打ち出したあと、カバーガラス上に約5 $\mu$ lのオイルを追加し、顕微鏡(オリンパス光学工業社製、1MT-2)で観察した。図14は、観察された水滴の透過顕微鏡写真である。図14の左側が(+)の溶液からなる水滴であり、右側が(-)の溶液からなる水滴である。水滴は直径約300 $\mu$ mのほぼ円形であった。次に、この2つ並んだ水滴を励起波長約480nmのB励起で蛍光観察した。図15は、図14のように並んだ(+)の水滴と、(-)の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真である。図15に示されるように、蛍光は弱く、ぼんやりとしか(+)の水滴と(-)の水滴の違いは分からなかった。

【0050】

次に、(+)と(-)の溶液を同様にカバーガラス上のオイル塗布領域55に

打ち出したあと、図16(a)に示すように、カバーガラス10の端部56, 57に両面テープ(ニチバン製、セルタックCW-18)を2枚重ねて貼り付けた、その上からカバーガラスをもう一枚貼り付けた。この両面テープの厚さは約70 $\mu$ mであり、2枚重ね合わせると厚さ約140 $\mu$ mになる。さらに、図16(b)に示すように、テープを貼っていないカバーガラスの端部に余分にオイル58, 59を追加した。

## 【0051】

カバーガラス10の中央付近を指で押さえ、水滴が油膜の上のカバーガラスに付着したのを確認したあと、ゆっくり指を離した。図16(b)のように端部に追加したオイルのおかげで、2枚のカバーガラスの間に気泡は入らなかった。

図17はこうして形成した水滴の透過顕微鏡写真であり、左側が(+)の水滴、右側が(-)の水滴である。このように、水滴は、図11(c)の模式図に示したように、円柱状になっていることが分かる。円柱の直径は約80 $\mu$ mであった。B励起で蛍光観察したところ、図18に示すように、(+)の水滴の方が(-)の水滴よりも強く光っている様子がはっきりと分かった。

## 【0052】

微小液滴中の光路長を増加させるための他の方法として、水滴を付着させる基板の材料として撥水性のあるもの、あるいは撥水性のコーティングを施したものを使用した。水滴が付着する基板61の表面に撥水性がない場合は、図19(a)に略示するように基板61との接触面積が大きくなるため、基板表面に垂直方向の水滴内の光路長が短くなる。一方、水滴が付着する基板62の表面に撥水性がある場合には、図19(b)のように基板表面に垂直方向の水滴64内の光路長が長くなる。

## 【0053】

ここでのいう撥水性とは、通常使用されるガラス基板に付着した水滴の接触角に対して、より大きな接触角を有する場合をいい、撥水性のある材料としては、例えばポリプロピレン、ポリエチレンなどの透明な材料を用いることができる。また、撥水性コーティング材は多数市販されており、本発明で用いることのできる撥水性コーティング材としては、例えばシグマ社のシグマコートをあげることが

できる。

【0054】

特開平4-262256号公報には、撥水性基板の上にインクジェットで吐出した液を載せる示唆があるが、これは本発明のように光路長を増大することを意図するものではない。また、米国特許第5474796号にも撥水性、親水性のパターンを作った上にインクジェットで液を載せる記載があるが、これは隣り合った液滴を空間的に分けるのが目的であり、同様に光路長を増大することを意図するものではない。

【0055】

次に、水滴の付着する表面を撥水性とすることの効果を確認するため、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス（18mm×18mm、厚さ0.12～0.17mm）にシグマ社のシグマコート塗布し、乾燥させ、撥水性コートをした。その後、実施の形態1と同様に、図4に示した台紙に接着し、インクジェットで水滴を打ち出して、撥水性コートのある場合とない場合の水滴の様子を比べてみた。使用したオイルは、信越化学工業製シリコンオイルKF96-30とKF-50を1：1の割合で混合したもので、オイルの塗布量は撥水性コートがあるものが2 $\mu$ l、撥水性コートのないものが3 $\mu$ lであった。インクジェットヘッドから打ち出した水滴のパターンは実施の形態1と同様にした。

【0056】

顕微鏡で観察した水滴の大きさ（基板垂直方向から見た水滴の直径）は、撥水性コートのある方が40 $\mu$ m程度であったのに対し、撥水性コートのない方は100 $\mu$ m程度であった。このことから、水滴の状態が図19のようになっており、撥水性コートを設けることによって基板垂直方向の水滴内光路長を増大することができることが分かる。

【0057】

なお、微小水滴中で化学反応を行うときは、複数のノズルから別々の試薬を同じ場所に吐出し、その場で混合することになる。このとき、図20（a）に示すように、微小液滴13が基板10の表面に付着していると、位置決めが容易であり、水滴（試薬）65の追加、混合が容易である。一方、図20（b）に示すよ

うに水滴15が油膜11中を漂っていると、新たな水滴（試薬）65の追加は困難である。このような試薬の追加という観点からも、微小液滴は基板表面に付着した状態で保持する必要がある。

【0058】

【発明の効果】

本発明によると、極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持することができ、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液による化学反応が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから微小液滴が打ち込まれる様子を模式的に示した図。

【図2】

微小液滴が保持されている状態を説明する図。

【図3】

油膜に打ち込まれた水滴の状態の一例を説明する図。

【図4】

カバーガラスをプリンターにセットするための台紙の説明図。

【図5】

インクジェットノズルによる水滴の打ち込みパターンを説明する図。

【図6】

打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図。

【図7】

打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図。

【図8】

保護用水滴あるいは複数の反応用水滴の配置図。

【図9】

反応容器の作製方法を説明する図。

【図10】

隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真。

【図11】

微小液滴中の光路長増大方法の説明図。

【図12】

カバーと基板表面の間隔を調整する機構の一例の説明図。

【図13】

ヒト男性DNAが入っている試料(+)と、入っていない試料(-)の蛍光スペクトルを示す図。

【図14】

水滴の透過顕微鏡写真。

【図15】

(+)の水滴と(-)の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真。

【図16】

カバーガラス上の油膜を他のカバーガラスで挟む方法の説明図。

【図17】

水滴の透過顕微鏡写真。

【図18】

(+)の水滴と(-)の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真。

【図19】

基板表面を撥水性とすることによる効果の説明図。

【図20】

新たな液滴の追加の説明図。

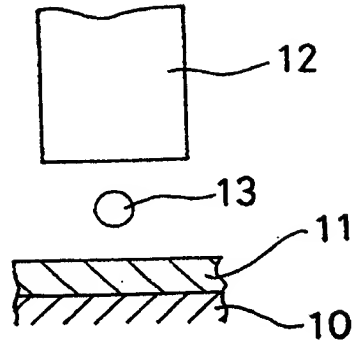
【符号の説明】

10…スライドガラス、11…油膜、12…インクジェットノズル、13、14、15、16…水滴、20…台紙、25…1ドットの水滴、32、33…水滴、40…反応用水滴、41…保護用水滴、45…コの字形両面シール、46…油膜領域、50…カバー、52、53…スペーサ、58、59…追加オイル、61…撥水性がない基板、62…撥水性がある基板、63、64…水滴、65…水滴(試薬)

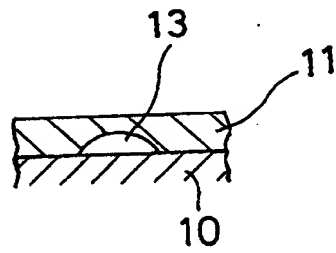
【書類名】

図面

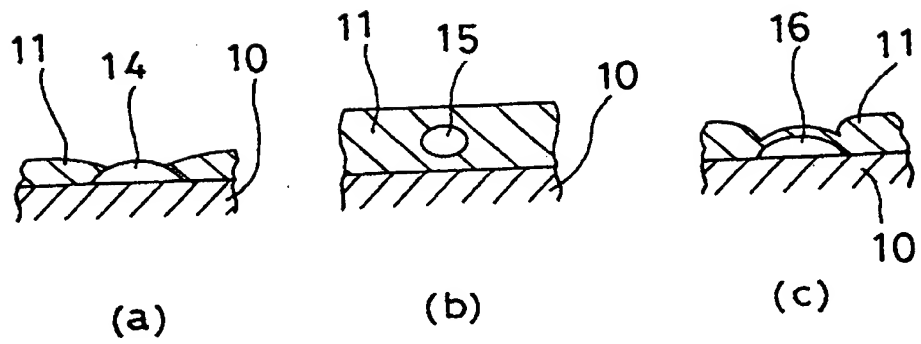
【図1】



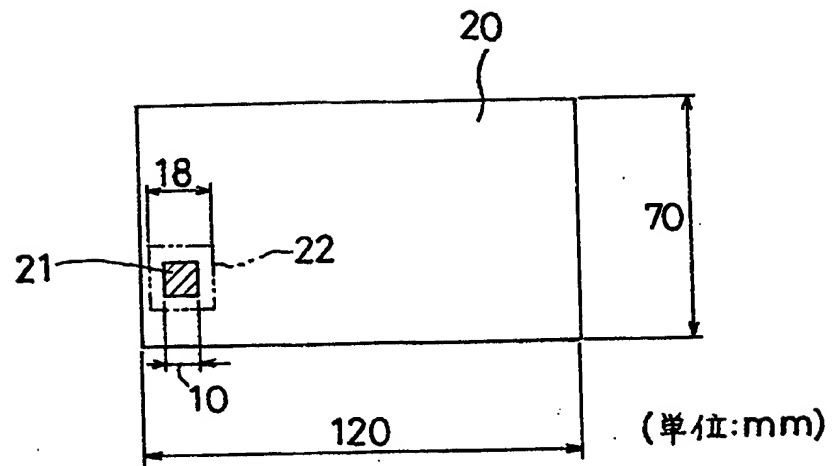
【図2】



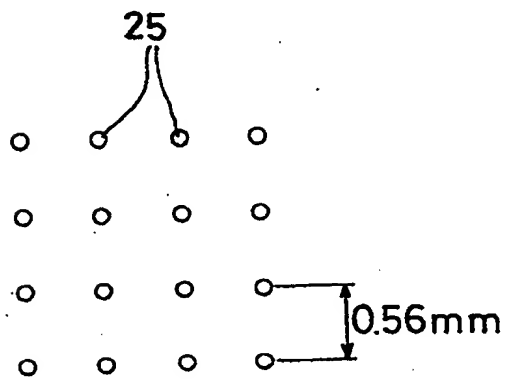
【図3】



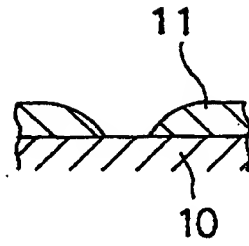
【図4】



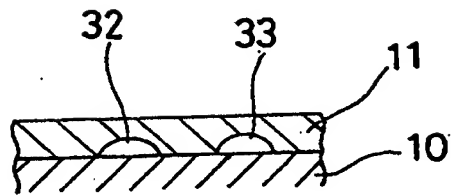
【図5】



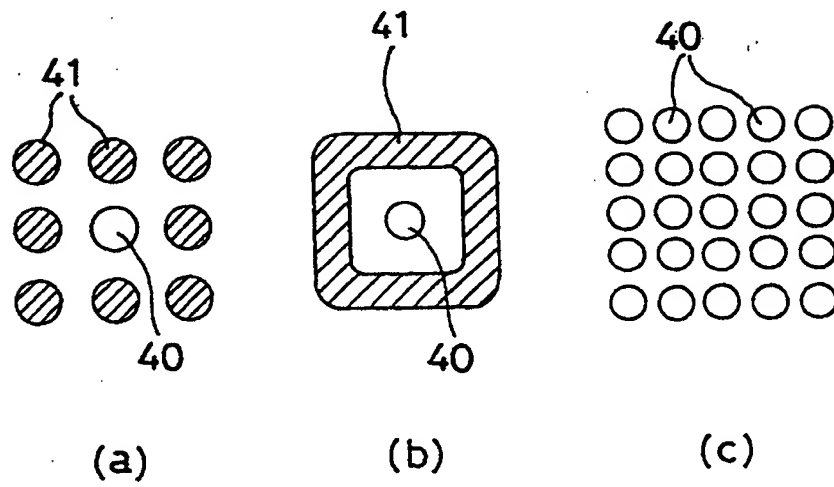
【図6】



【図7】

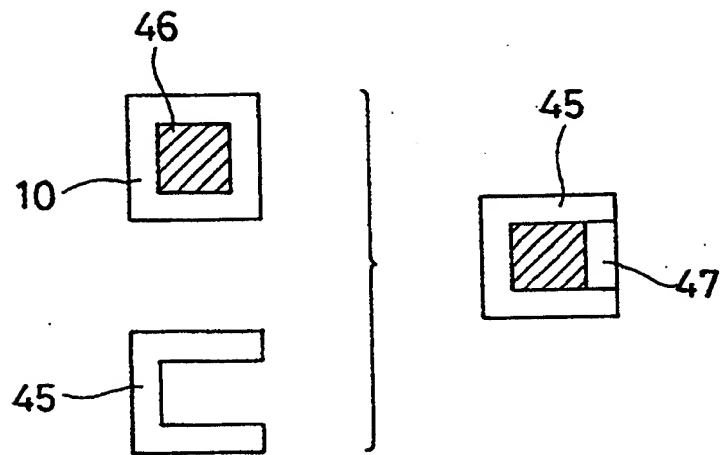


【図8】

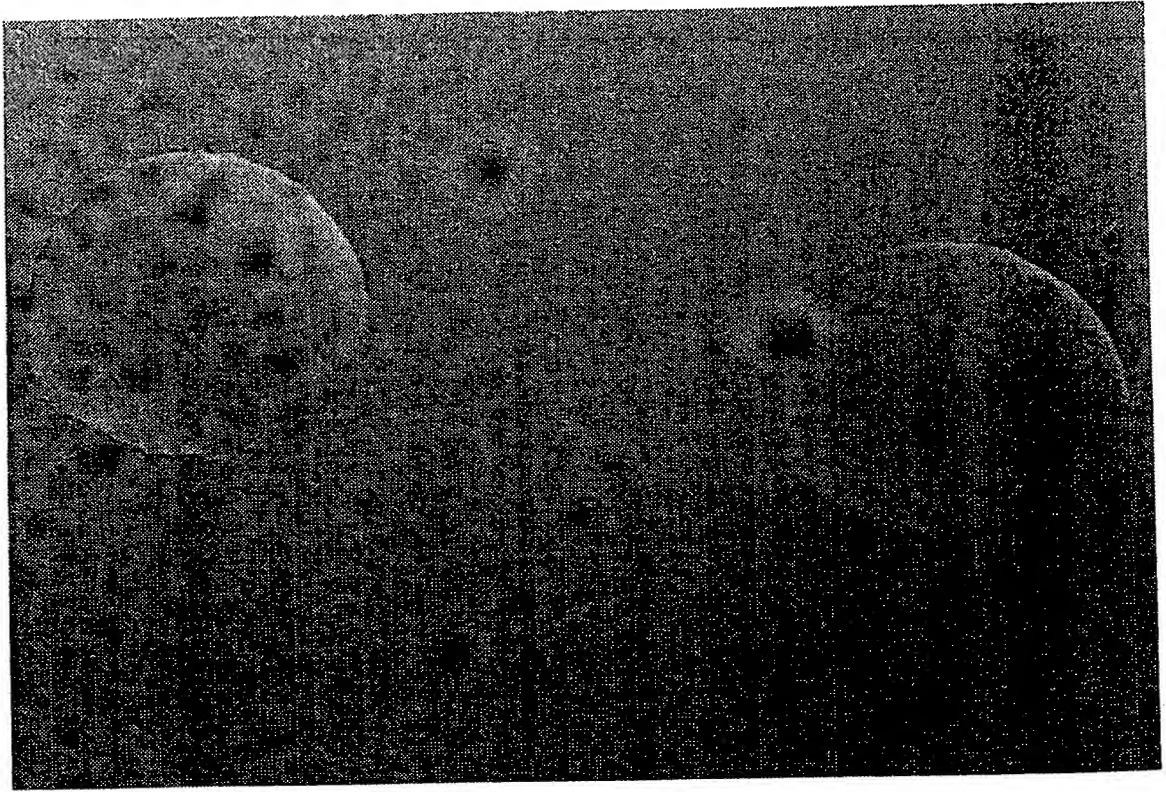




【図9】

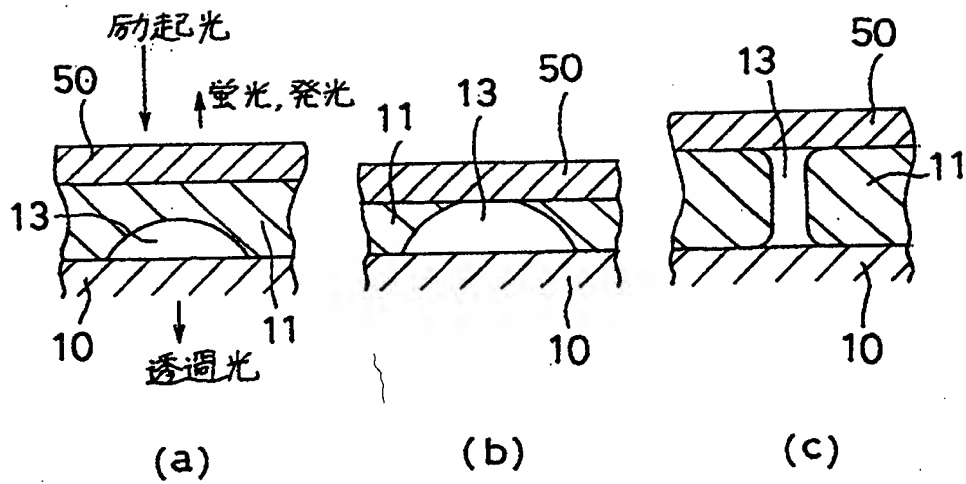


【図10】

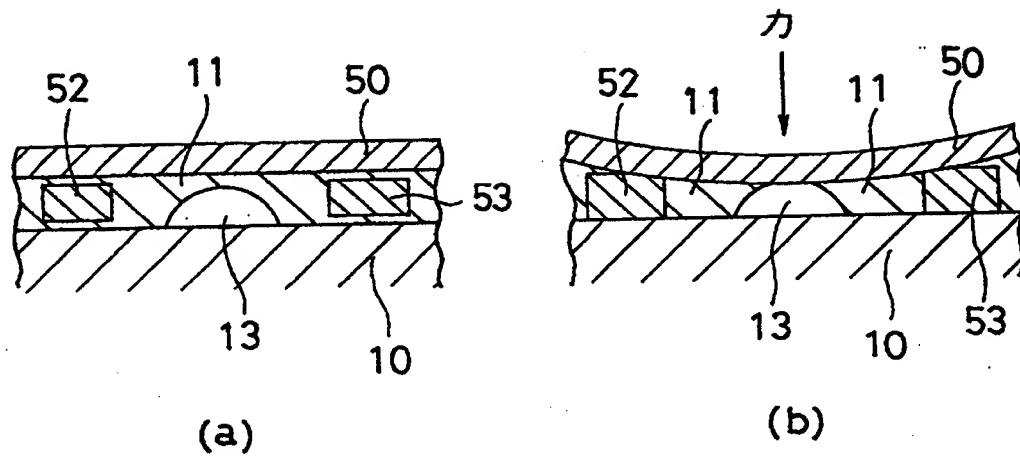


図面代用写真

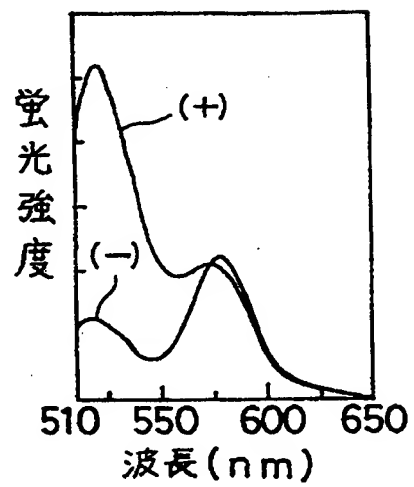
【図11】



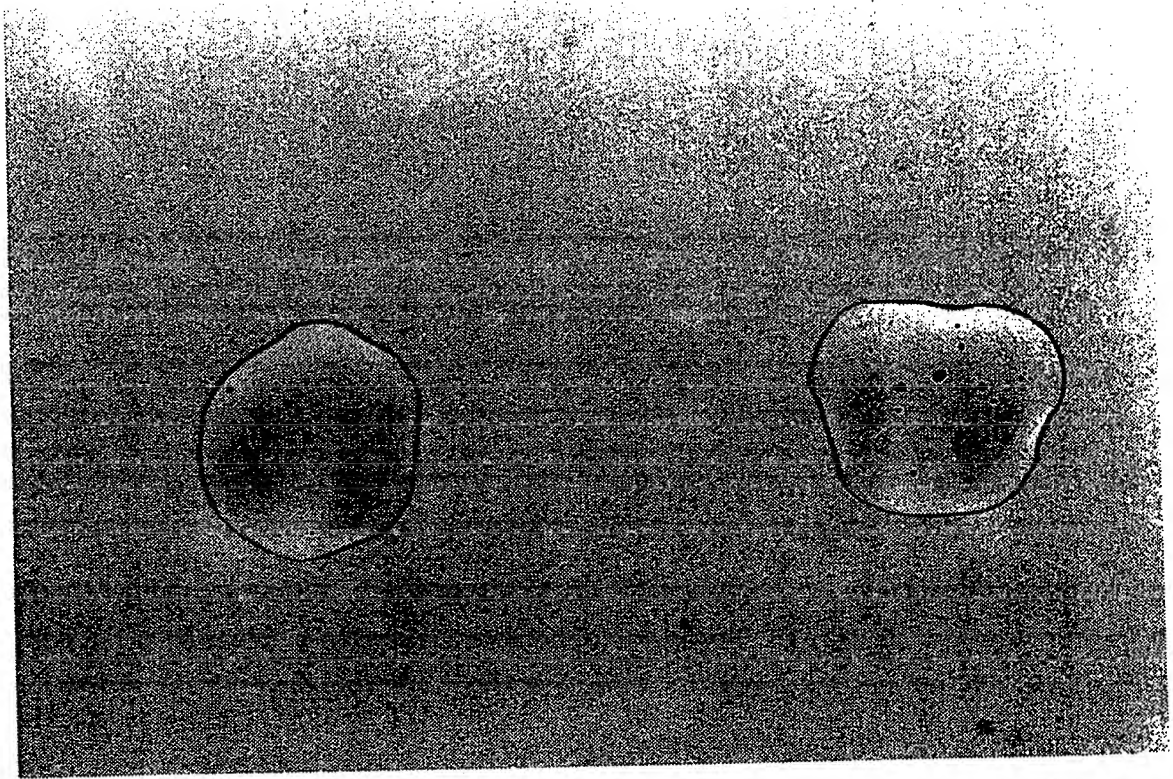
【図12】



【図13】

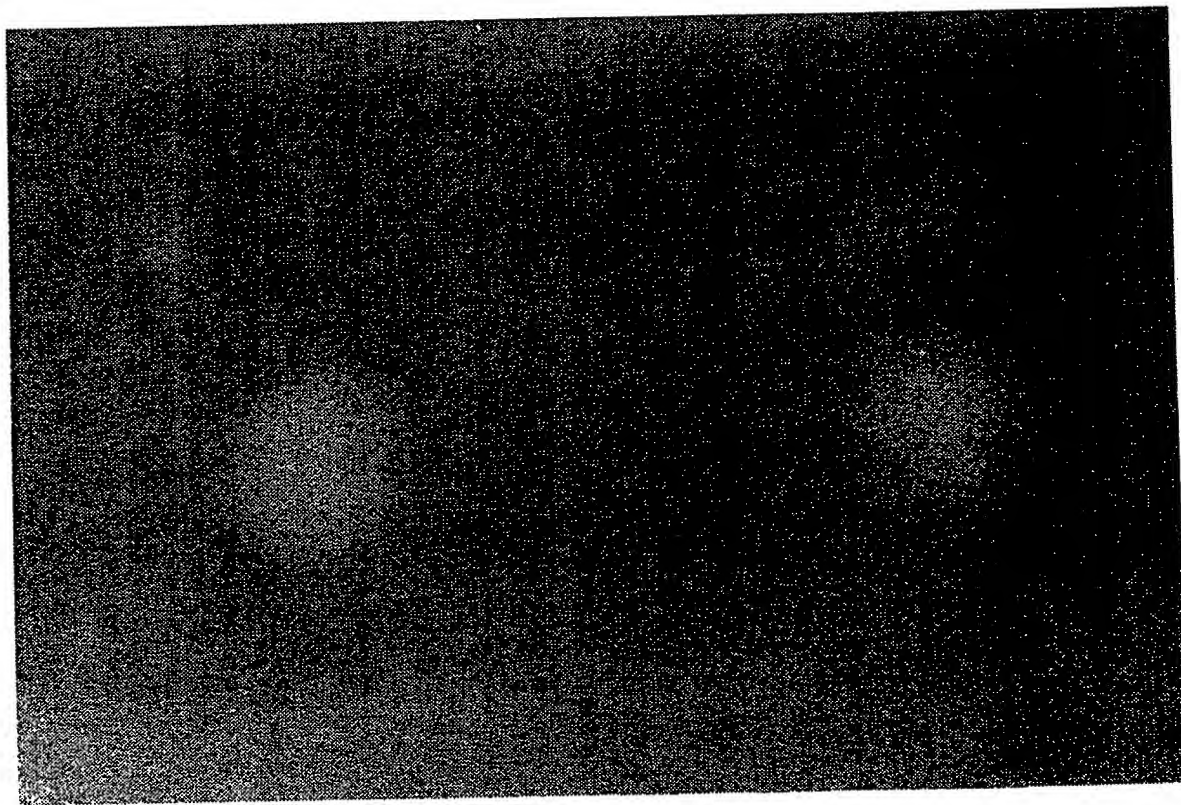


【図14】



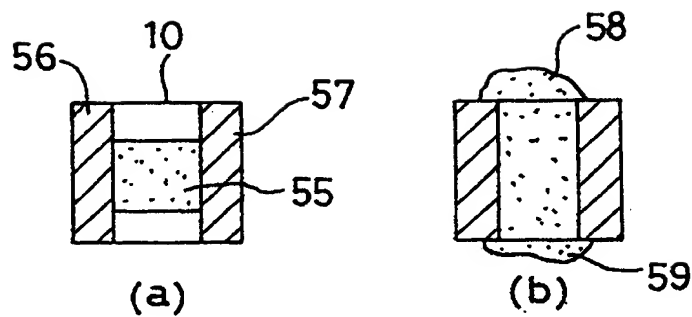
図面代用写真

【図15】

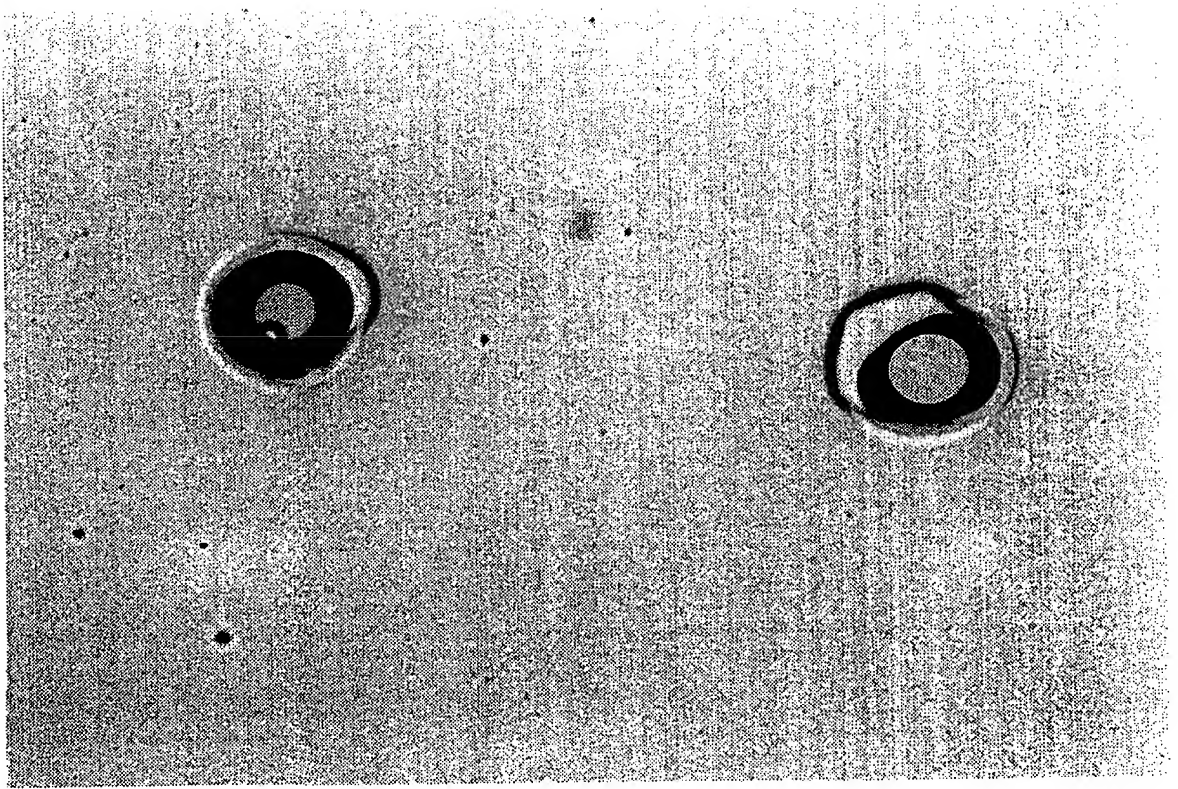


図面代用写真

【図16】

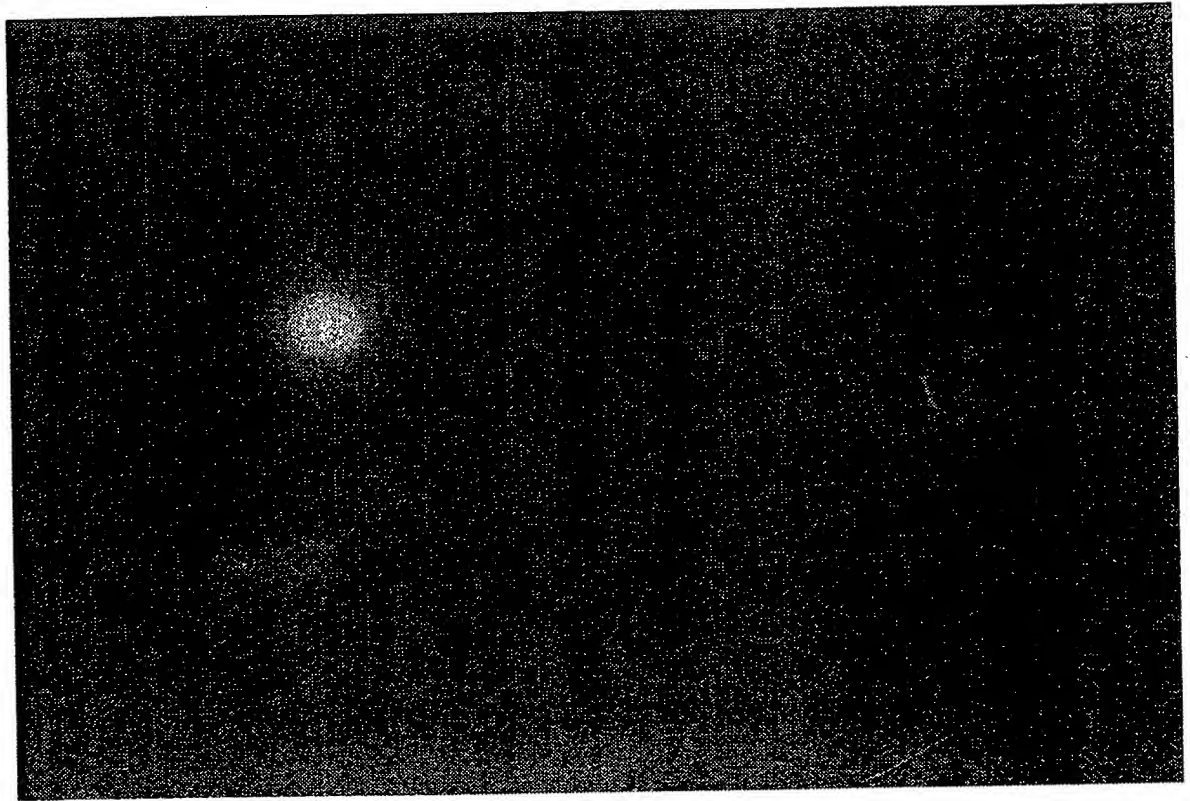


【図17】



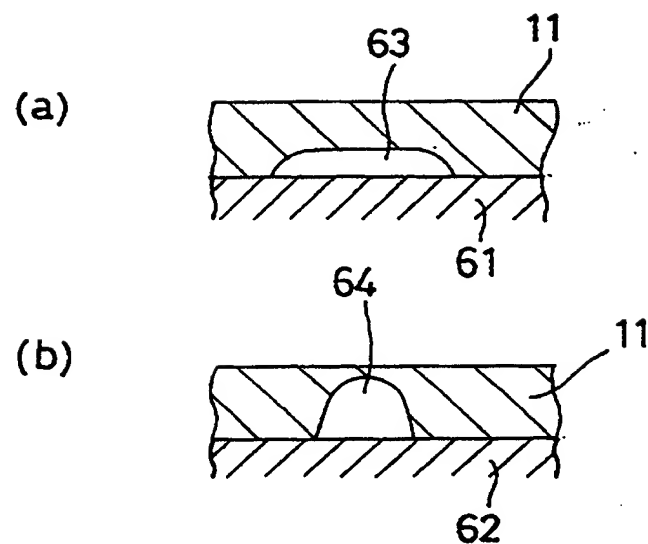
図面代用写真

【図18】

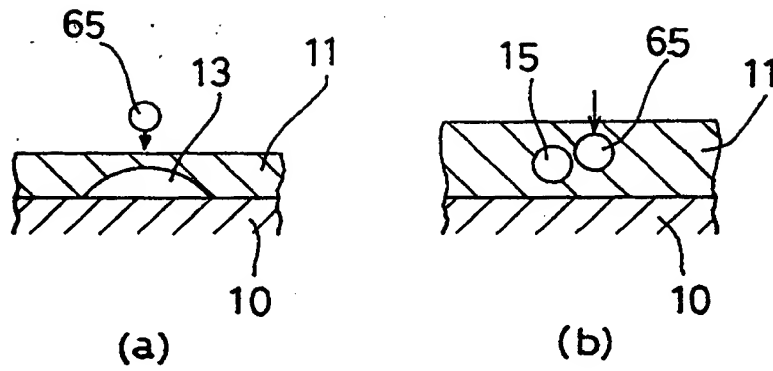


図面代用写真

【図19】



【図20】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 化学反応などのためにインクジェット法によって吐出された極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持する。

【解決手段】 基板10上に、保持したい極微量の溶液（微小液滴）と混合しにくいオイルなどの液体層11を形成し、その液体層11中で微小液滴13を基板10の表面に接触させて保持する。微小液滴13が水性のとき、基板表面に被覆される液体層11は油性とすることができる。

【選択図】 図2

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000003207

【住所又は居所】

愛知県豊田市トヨタ町1番地

【氏名又は名称】

トヨタ自動車株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100091096

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

平木 祐輔

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102576

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

渡辺 敏章

特平 9-177857

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003207]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市トヨタ町1番地
氏 名	トヨタ自動車株式会社

## 明細書

### 微小液滴の保持方法、反応方法及び反応容器

#### 技術分野

本発明は、化学反応などに用いられる極微量の溶液をガラスプレート表面などに安定に保持する方法、微量の試薬を用いてPCR反応等の反応を行う方法及びそれに用いるに適した反応容器に関する。

#### 背景技術

近年、バイオテクノロジーの分野では、PCR (polymerase chain reaction) やEIA (enzyme immunoassay) などの反応が利用されている。これらの反応においては、コスト削減などの観点から、反応液量の微量化が重要である。紙にインクを付着させて文字や画像を可視化するインクジェットの技術は、もともとは印刷のために開発されたものではあるが、極微量の液体を正確かつ高速に分注可能であり、反応液量の微量化のための技術として応用が図られてきた。

特許第4, 877, 745号明細書及びBioTechniques 15, 324(1993)にはインクジェット技術の分注器としての利用法が記載され、米国特許第5, 449, 754号明細書及び米国特許第5, 474, 796号明細書にはインクジェット技術の有機化学合成への応用が記載され、特開平4-262256号公報、特開平4-289457号公報及びAnalytical Chemistry 67, 3051にはインクジェット技術の免疫学的反応への応用が記載されている。例えば、特開平4-262256号公報には、必要な試薬をインクジェットによってフィルム上に印刷しておき、使用時に50 $\mu$ L (マイクロリットル) 程度のサンプル溶液を加え、試薬を溶出させて反応を行い、洗浄、発色を経て検出する方法が記載されている。

このように、化学反応における反応溶液の分注器としてインクジェットを利用することが考えられているが、臨床検査などで多数の反応を並列的に行う場合、試薬コスト低減のため個々の液量はできるだけ少ない方が望ましく、例えば100 nL (ナノリットル) 以下とするのが望ましい。しかし、これまでインクジェットを利用して100 nL以下、例えば10 nL～1 pL (ピコリットル) 程度の極微量の液中で臨床検査の反応、例えばPCRや免疫学的反応を行った例は報告されていない。前記した特開平4-262256号

公報の例では、反応時の液量は50  $\mu$ Lであり、極微量とはいえない。

インクジェットを用いて極微量の反応を行った例がこれまで報告されていない理由の一つは、インクジェットで分注した極微量の水溶液は、空気中では数秒程度で蒸発してしまうからである。米国特許第5,449,754号明細書におけるように一瞬で完了する有機化学反応では極微量の反応例が報告されているが、通常の臨床検査の反応には数分から数時間の時間がかかり、その間反応液を蒸発させずに空気中に保持しておくのは困難である。

また、極微量の反応をするために不可欠というわけではないが、蛍光法、比色法などにより反応の有無を検出するとき、反応液が極微量では通常の液量の場合と比べて光路長が著しく短くなり、検出が困難になる。従って、測定の際の光路長を長くするための工夫が必要である。

#### 発明の開示

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みてなされたもので、化学反応などのために例えばインクジェット法によって吐出された極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液に対する光学的検出を容易にするため、光路長を増大させる方法を提供することを目的とする。

本発明は、また、インクジェット法によって吐出された微量の試薬を用いてPCR反応などの反応を行わせる方法、及びそれに用いるのに適した反応容器を提供することを目的とする。

本発明では、例えばガラス平板などの基板上に、保持したい極微量の溶液（微小液滴）と混合しにくいオイルなどの液体層を形成し、その液体層中で微小液滴を基板表面に接触させて保持することで前記目的を達成する。微小液滴が水性のとき、基板表面に被覆される液体層は油性とすることができる。また、微小液滴は、基板表面に被覆された液体層の表面からインクジェット技術などにより打ち込むことができる。

基板上に形成する液体層の粘度や膜厚を適当に選択することにより、液体層の表面から打ち込まれた微小液滴は基板表面に付着し、液体層の内部に隠れた状態で安定に保持される。微小液滴は、それと混合しない液体により周囲を覆われているため、蒸発を大幅に減

少することができる。また、基板表面に付着して保持されていて位置が固定されているため、この状態でインクジェット技術によってさらに試薬を追加することも可能である。

例えば、インクジェット法によって液体層に打ち込む微小液滴の量が40 pLのとき、液体層の最適粘度は20～50 cP、最適膜厚は20～30 μmである。基板表面に被覆する液体層の膜厚が薄すぎると、微小液滴はその一部分が液体層から露出し、蒸発してしまう。また、液体層の膜厚が厚すぎると、微小液滴は液体層中を浮遊して位置が定まらないため、試薬の追加などが困難になる。

基板表面に撥水性をもたせることもできる。ここで撥水性とは、基板表面に付着した液滴において、基板表面に対する液滴の立ち上がり角度（接触角）の大きさを表現されるもので、接触角が大きいほど撥水効果が大きい。また、本発明においては、通常使用されるガラス基板に付着した液滴の接触角に対して、より大きい接触角を有する基板表面について撥水性を有すると表現する。この撥水性は、基板自体をポリプロピレンなどの撥水性を有する材料で作製することで付与してもよいし、基板上に撥水性材料をコーティングすることで付与してもよい。

基板表面が撥水性を有していると、基板表面に付着した水性の微小液滴は基板との接触面積が小さくなって液体層の膜厚方向に立ち上がる。従って、微小液滴中で生じる化学反応を基板に垂直な方向から蛍光法や比色法などの光学的方法によって検出するとき、光路長が増大するため検出が容易になる。この場合、撥水性を有する基板あるいは撥水性コーティングは、微小液滴の光学的測定に影響を与えるものではないことが必要である。

基板を覆っている液体層中に微小液滴を打ち込んで基板表面に微小液滴を保持したのち、液体層の上に透明なスライドガラス等のカバーをかけるようにすると、加熱の際に生じる対流などによって液体層の液面が乱れるのを防止し、微小液滴が液体層から露出して蒸発するのを防止することができる。カバーをかけるに先立って、液体層に液体を補充してもよい。

また、液体層中に打ち込んだ微小液滴の近くの液体層中に他の水性液体を配置することも微小液滴を安定に保持する上で有効である。液体層中に保持されている微小液滴は、反応過程で加熱した際などに周囲の液体に溶出して体積が減少する傾向がある。反応を行う水性の微小液滴のすぐ近くに他の水滴を配置すると、微小液滴の近くの液体層の局所的な水分含有量を大きくすることができ、反応を行う微小液滴の溶出防止に効果がある。溶出防

止用の水滴の代わりに、反応を行う微小液滴を密集して配置することでも同様の溶出緩和効果が得られる。

さらに、光学的測定のための光路長増大の点からは、微小液滴を液体層の上に配置した透明カバーにも接触させるのが望ましい。これは、基板とカバーとの間の間隔を狭めて微小水滴を一度カバーに接触させ、そののち基板とカバーの間隔を再び広げることにより実現できる。そのためには、基板とカバーとの間のスペーサとして弾性のある部材を用いるのが好ましい。基板とカバーの間隔を狭める動作は、最も簡単には指でカバーを押圧することによって行うことができるが、精密モータや圧電素子を用いてカバーを基板側に押圧することで行ってもよい。このように微小液滴を基板表面とカバー底面の両方に接触させて保持することにより、微小液滴内の基板垂直方向の光路長を増大することができるとともに、光路長を一定にすることが可能となり、測定の精度及び信頼性を向上することができる。

本発明の反応容器は、透明な下板と、厚さ0.05 mm以下のスペーサと、透明な上板とからなり、スペーサで囲まれた領域に溶液を収容することを特徴とする。スペーサは両面接着テープとすることができ、また、溶液との接触部位はウシ血清アルブミンコートをするのが好ましい。

PCRチャンバとしては、エッチング技術によって作製されたPCR小型反応チャンバがいくつか発表されている（例えば、松本壮平、工業技術院機械技術研究所発行「機械研ニュース」533号、No. 5、6～8頁、1996年）。これらの反応容器は、内部全体にPCR反応液を満たして使用するもので本発明の反応容器とは使用方法が異なるが、図21に示した本発明の反応容器は、エッチングで作製されるPCRチャンバと比較しても、①量産品のカバーガラスに簡単なコーティングを施し、スペーサも簡単な紙加工で作製するものであるため、構造が簡単で安価である、②エッチングで作製されたPCRチャンバは表面仕上げが粗く、沸騰気泡核が存在し、それによって気泡が発生したり、温度制御が影響を受ける（前述の文献参照）が、本発明の反応容器は、通常のガラス等の材料を張り合わせたものなので、必要なだけ精密な表面仕上げが可能である、③エッチングで作製されたPCRチャンバでは、全体の組立が終わってから、細い流路が詰まらないようにコーティングのための薬品を流し、その後乾燥させるというコーティングの方法をとり、この方法で可能なコーティング手法はシリコンコートなどに限られていが、本発明の反応

容器は、組立前にコーティングを行うので、スピナーの利用、ポリマーのラミネート等あらゆる手法が可能であり、内部表面のコーティングが容易である、などの利点を有する。

本発明は、PCR法、免疫アッセイ等の微量試料の反応に適用することができる。高温反応（50℃以上）を伴うPCR以外の生化学反応、例えばLCR（リガーゼチェーンリアクション）ハイブリダイゼーション等にも有効である。本発明による反応方法は、微小液滴を基板表面に被覆された微小液滴と2相に分離する液体層中で基板表面に接触させて保持するとともに液体層表面をカバーで覆い、微小液滴中で反応を行わせることを特徴とする。微小液滴はDNAを含む水性液滴とすることができ、基板表面に被覆された液体層は油性の液体層とすることができ、

微小液滴はインクジェット技術によって吐出することで基板表面に付着させることができる。微小液滴は、予め油性の液体層で被覆されている基板に、その液体層の表面からインクジェットヘッドによって基板表面に達するように打ち込んでもよいし、液体層で被覆されていない基板表面に直接吐出して付着させ、その後に油性の液体層を塗布するようにしてもよい。

微小液滴の接触部位は、シリコンコートなどの酵素吸着防止剤を有するのが望ましい。また、微小液滴の接触部位はウシ血清アルブミンコート有するのが好ましい。ウシ血清アルブミンコートは、特に微小液滴を液体層で被覆されていない基板表面にインクジェットヘッドから吐出して付着させる場合、微小液滴の付着性を改善する効果がある。

反応容器内部のコーティングとしては、これ以外にも種々のコーティングを利用することができる。反応容器内面のコーティングの条件としては、一般に、①酸素の吸着が少ないこと、②水滴の付着性が良好であること、が望ましいが、これらの条件を満たすコーティングとして、親水性ポリマーによるコーティングがある。これらのコーティングは、もともと人工臓器などの医療器具や分析用キャピラリカラムにおいてタンパク質の吸着を防止するために開発されたもので、これまで多数の例があり、容易に反応容器のコーティングに適用可能である。

親水性ポリマーとしては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドンなどがあげられる。また、水に不溶な、医療器具のコーティングなどに使用される親水性ポリマーとしては、例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン- $n$ -ブチルメタク



リレート) 共重合体などがあげられる。(岩崎ら、表面技術、46巻、10号、880～886頁、1995年)、この中で、市販されていて入手しやすいポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)を例にコーティング方法の一例を説明する。

ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(シグマ アルドリッチジャパン製)0.2gをジメチルホルムアミド(ナカライ製)2mLに溶解した。図41に示すように、このコーティング液143をロの字型スぺーサシール142を張り付けたカバーガラス141上のガラスが露出している中央部分に20 $\mu$ L塗布した。このとき、もし、スぺーサシール142がなければ、塗布した液はガラス表面ではじかれてしまい、均一に塗布することが不可能になる。塗布終了後、真空乾燥すると、図42に示すように、均一な透明なコートが得られた。

また、タンパク質の材料表面への吸着を防ぐため、キャピラリ電気泳動の分野では、キャピラリ内面(熔融石英)に共有結合的にポリマー固定する方法が知られており、反応容器のコーティングに適用できる。例えば、ポリエチレングリコールの固定(G. J. M. BRUIN ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー、471巻、429～436頁(1989年))、ポリアクリルアミドの固定(S. HJERTEN ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー、347巻、191～198頁(1985年))などがある。

さらに、シリコンコートと同等以上の効果を持つコーティング法として、フッ素樹脂によるコーティングがある。フッ素樹脂によるコーティング法は多数知られている。この場合も、さらに、ウシ血清アルブミンを塗布するなどの水滴付着性を増加させる処理が必要である。

なお、薬品による表面処理は、時にはコストが高く、効果が低い場合が考えられる。このような場合には、反応容器に薄いタンパク質が吸着しにくい樹脂フィルムを張り付ける方法を用いてもよい。利用できる樹脂フィルムの一例としては、フッ素樹脂フィルム、サイトップ(旭硝子製)があげられる。この場合、フィルム表面の撥水性が高いため、さらに、ウシ血清アルブミンを塗布するなど水滴付着性を増加させる処理が必要である。また、水滴付着性を向上させるための方法として、イオンビーム等の照射(例えば、雀部ら、高分子加工、44巻、10号、434～439頁、1995年)を利用してもよい。

基板表面に被覆された液体層は、オイル中への試薬溶液溶出防止の観点から、厚さが100 $\mu$ m以下とするのが好ましい。

本発明の反応方法によると、反応1バッチあたりの液量が微量化され、試薬コストを低減することができる。また、コピー数が同じであれば、反応液量が少ないほどサイクル数が短縮できる。たとえば、反応液量が $1/1000$ になれば、理論上  $\log_2 1000 = 10$  サイクル短縮される。サイクル数短縮によって、反応時間が短縮し、また、副反応（非特異的増幅、プライマー2量体生成）が減少するため、ターゲット検出限界が向上する。

さらに、本発明の反応方法によると、PCRの量子化による定量が可能になる。すなわち、ひとつの反応液をたくさんのバッチに小分けすると、各バッチ毎にターゲットが1コピー存在するかしないかという状態になる。この状態で、PCRを行うと、ターゲットの濃度に比例して、PCRが進行したバッチの数が増加する。そのため、PCRが進行したバッチ数を計数することにより、元のサンプル中のターゲット濃度の正確な測定が可能になる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから微小液滴が打ち込まれる様子を模式的に示した図、図2は微小液滴が保持されている状態を説明する図、図3は油膜に打ち込まれた水滴の状態の一例を説明する図、図4はカバーガラスをプリンターにセットするための台紙の説明図、図5はインクジェットノズルによる水滴の打ち込みパターンを説明する図、図6は打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図、図7は打ち込まれた微小液滴の保持に失敗した状態の一例を示す説明図、図8は保護用水滴あるいは複数の反应用水滴の配置図、図9は反応容器の作製方法を説明する図、図10は隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真、図11は微小液滴中の光路長増大方法の説明図、図12はカバーと基板表面の間隔を調整する機構の一例の説明図、図13はヒト男性DNAが入っている試料（+）と、入っていない試料（-）の蛍光スペクトルを示す図、図14は水滴の透過顕微鏡写真、図15は（+）の水滴と（-）の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真、図16はカバーガラス上の油膜を他のカバーガラスで挟む方法の説明図、図17は水滴の透過顕微鏡写真、図18は（+）の水滴と（-）の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真、図19は基板表面を撥水性とすることによる効果の説明図、図20は新たな液滴の追加の説明図、図21は本発明による反応容器の分解組立図、図22は反応容器内にPCR反応液を入れた反応容器の使用状態の一例を示す上面図、図23は本発明によるホルダーの一例の分解組立図、図24は反応容器を組み込んだホルダー

一の全体図、図 25 は反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図、図 26 は本発明のホルダーを使用した場合の温度変化を示す図、図 27 は比較例（上蓋あり）の温度変化を示す図、図 28 は比較例（上蓋なし）の温度変化を示す図、図 29 は比較例（アルミホイル使用）の温度変化を示す図、図 30 は比較例（断熱材使用）の温度変化を示す図、図 31 は本発明によるホルダーの他の例を示す分解組立図、図 32 は反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図、図 33 は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図 34 は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図 35 は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図 36 は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図 37 は DNA ポリメラーゼの濃度を变化させた反応液の反応終了後の蛍光スペクトルを示す図、図 38 は反応終了後の反応液の蛍光スペクトルを示す図、図 39 は温度サイクルをかけたサンプル（+）と、かけないサンプル（-）の蛍光における R と G の割合をプロットした図、図 40 は電気泳動による分析結果を示す写真、図 41 は反応容器に親水性ポリマーを塗布する手順を示す説明図、図 42 は反応容器に親水性ポリマーを塗布する手順を示す説明図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、図面を用いて本発明の実施の形態を説明する。

#### 実施の形態 1

ここでは、微小液滴を保持する基板として顕微鏡観察用のカバーガラスを、微小液滴として水滴を、基板表面に被覆する微小液滴と混合しにくい液体としてオイルを用い、カバーガラス表面を被覆している油膜の中にインクジェットノズルから水滴を打ち込んで、水滴が基板表面に安定に保持される条件を探索した。

図 1 は、油膜を被覆したカバーガラスにインクジェットノズルから水滴が打ち込まれる様子を模式的に示した図である。スライドガラス 10 の表面には油膜 11 が塗布されている。インクジェットノズル 12 から所定の速度で吐出された水滴 13 は、スライドガラス 10 の上方からその表面を被覆する油膜 11 中に打ち込まれる。油膜 11 中に打ち込まれた水滴 13 は、図 2 に示すように、水滴 13 の全体が油膜 11 の内部に隠れ、なおかつスライドガラス 10 の表面に付着した状態にする。この状態で、水滴 13 は油膜 11 に保護され、蒸発することなく長時間安定に保持される。また、スライドガラス 10 の表面に付

着しているため、水滴 13 の位置的安定性も確保される。

基板 10 に塗布する油膜 11 の粘度、膜厚は、打ち込む水滴 13 の量、速度によって最適な値の範囲が決まる。油膜 11 の粘度、膜厚が不適切であると、図 3 (a) のように水滴 14 が油膜 11 の上部に露出して空気に触れ、蒸発してしまう。あるいは、図 3 (b) のように水滴 15 が油膜 11 の内部に浮いてしまう。油膜中に浮遊した水滴 15 は、やがては油膜と空気のと境界に到達し、蒸発してしまう可能性が高い。

水滴を多く分注すると、図 3 (c) のような状態になることが多い。これは、油膜 11 の内部に水滴 16 が入ったものの、油膜 11 の表面がくぼんでいる状態である。オイルの粘度が不適切な場合、図 3 (c) の状態からすぐに図 3 (a) のような状態に移り、水滴の表面から油膜がなくなって、やがて蒸発してしまう。しかし、オイルの粘度が適切な場合、水滴の表面に油膜はしばらく保持される。この場合には、図 3 (c) の状態の時にさらにオイルを加えることで、図 2 のような状態にもっていくことができる。

次に、具体的な例について説明する。微小液滴を吐出するために、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタ MJ-500C を実験に使用した。モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、吐出させた。プリンタの制御は、パーソナルコンピュータ (NEC 製、PC9801ns) でコントロールコード「EPSON ESC/P J84」のイメージ処理機能を使用して行った。

このときの縦方向、横方向のドット密度はいずれも 360 ドット/インチであった。このプリンタの解像度はセミ 720 dpi (720 dpi × 720 dpi で、隣接するドットは印刷しない) であるので、1 ドットは実際には 2 滴からなると思われる。超純水を 98304 ドット吐出したとき、全体の液量は 4.0  $\mu$ L であったので、1 ドットあたりの液量は約 40 pL である。

水滴を付着させる基板としては、顕微鏡観察用カバーガラス (マツナミ製、18 mm × 18 mm、厚さ 0.12 ~ 0.17 mm) を使用した。このカバーガラスをプリンタにセットするため、図 4 に示すような台紙を使用した。台紙 20 は、コピー用紙又はオーバーヘッドプロジェクタ用の透明シートで作り、図中に斜線で示した左下の 10 mm × 10 mm の部分 21 を観察用にくり抜いたものである。この台紙のくり抜かれた部分を含む 18 mm × 18 mm の部分 22 に両面接着テープ (ニチバン製セルタック CW-18) でカバ

ーガラスを裏側から接着した。

カバーガラスを接着した台紙をプリンタにセットし、カバーガラス上に後述するオイルからなる油膜を塗布した。油膜を塗布する範囲は、カバーガラスの中央部10mm×10mmの台紙がくり抜かれた部分21である。マイクロピペットで一定量(1μL~5μL)のオイルをカバーガラス上においたあと、ピペットの先端で10mm×10mmの範囲に均等に塗布した。

油膜を塗布したあと、プリンタで水滴を打ち込んだ。水滴の打ち込みパターンは図5に示したとおりであり、1ドットの水滴25を8/360インチ(0.56mm)の間隔で、縦横それぞれ4つずつ、計16カ所に打ち込んだ。

顕微鏡(オリンパス光学工業製倒立型顕微鏡1MT-2)で観察すると、打ち込まれた水滴の保持に成功した場合には、水滴が油膜の底でカバーガラスに付着し、水滴全体が油膜の内部に隠れた状態になる。この状態を模式的に表すと図2のようになる。このとき、水滴は直径約100μmで、ほぼ円形に観察された。

打ち込まれた水滴の保持に失敗した場合には、図6のように、油膜11がとぎれてカバーガラス10の表面がむき出しになって観察されることがある。これは、図3(a)の状態から水滴が蒸発したものと考えられる。また、観察される水滴の大きさが異常に小さい(直径50μm以下)ことがある。これは、図3(a)の状態からある程度水滴が蒸発した後、図2に示す正常な保持状態になったためと思われる。水滴が実際にこのようにして蒸発していく様子を時には顕微鏡下で観察できることもある。このようなタイプの失敗は、主として油膜が薄すぎる場合に起こる。

また、図3(b)に示すように、水滴が油膜中に浮遊しているのが観察される場合もある。あるいは、図7のように、離れた場所に2つの水滴32, 33が観察されることもある。これは、1ドットが2滴からできているため、2つの水滴が油膜11中を漂ったのち、別々の場所でカバーガラス10に付着したためと思われる。このようなタイプの失敗は、主として油膜11が厚すぎる場合に起こる。

最適な油膜の条件を検討するため、オイルの種類、及び膜厚を変えて図5のようなパターンで水滴を打ち込む実験を3回行い、水滴が正常な状態で保持される割合、すなわち図2に示したように、水滴13の全体が油膜11の内部に隠れ、なおかつスライドガラス10の表面に付着した状態になる割合を調べた。結果を表1に示す。表中の数字は、水滴打

ち込みの成功率 (%) を表す。また、オイルとしては以下のものを使用した。

A : シグマ社製ミネラルオイルM5904 (粘度20 c p)

B : 信越化学工業 (株) 製シリコンオイルKF96-30 (粘度30 c p)

C : 上記Bと下記Eを1 : 1の割合で混合したオイル

D : ベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246 (粘度40 c p)

E : 信越化学工業 (株) 製シリコンオイルKF96-50 (粘度50 c p)

F : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度50 c p)

G : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度100 c p)

H : 昭和石油製粘度計校正用標準液 (粘度200 c p)

表1

オイルの 種類	塗布したオイルの量 ( $\mu$ L)				
	1	2	3	4	5
A	42	65	58	27	0
B	100	100	58	23	6
C	100	100	96	77	0
D	100	100	85	38	0
E	94	98	79	27	0
F	6	54	10	0	0
G	10	48	27	2	0
H	0	15	27	17	0

表1より、ここでの実験条件に対して最適なオイルの粘度は30~40 c p、オイルの量は1~2  $\mu$  L (油膜の厚さに換算して10~20  $\mu$  m) であることがわかる。

## 実施の形態2

実施の形態1で説明したように、微小液滴を保持する基板上に油膜を塗布し、その油膜内部に微小液滴を保持することにより、空気中への水滴の急速な蒸発を防止することができる。しかし、これだけでは極微量の反応を行うのに充分とはいえない。通常、オイルは一定の水分を含有することができる。例えば、シリコンオイルの場合、含有できる水分は100~200 ppmである。そのため、油膜中に長時間極微量水滴を放置したり、反応を促進するために加熱したりすると、微小液滴中の水分が周囲の油層に溶出し、蒸発した

のと同じ状態になってしまう。

水滴の油層への溶出を防止するための効果的な方法としては、図8 (a) のように、実際に化学反応を行う水滴40のまわりに保護用の水滴41を配置すればよい。このように配置すると、反応用水滴40の油層への溶出速度が遅くなる。これは、反応用水滴40付近のオイルの水分含量が保護用水滴41によって局所的に上昇するためと考えられる。

保護用水滴41の組成は何でもよく、ただの蒸留水でもよい。反応用水滴40は高価な試薬を含むため、量を増やすとコストがかかることになるが、保護用水滴41は安価なため量を増やしてもコストは無視できる。したがって、保護用水滴41は、必要なだけ量を多くすることができる。保護用水滴41は、反応用水滴40のまわりにたくさんあればよく、例えば図8 (b) に示すように反応用水滴40を包囲して配置するなど種々の配置が考えられる。保護用水滴41を使用する代わりに、図8 (c) に示すように、反応用水滴40同士を互いに密集させて配置しても同様に反応用水滴の油層への溶出速度を緩和する効果が得られる。

次に、保護用水滴を配置することの効果についてより詳細に説明する。実施の形態1と同様に、セイコーエプソン社製のインクジェットプリンタMJ-500Cを用い、モノクロ印字用ヘッドに、東レ製「TORAY PURE LV-10T」で製造した超純水を充填し、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス(18mm×18mm、厚さ0.12~0.17mm)を実施の形態1と同様に、図4に示す台紙にセットしてその上に超純水を打ち出した。カバーガラスに塗布したオイルはシグマ社のミネラルオイルM5904、量は3 $\mu$ Lである。打ち出しパターンは図5と同じであるが、重ね打ちを10回行った。そのうちオイルをさらに20 $\mu$ L追加し、顕微鏡で観察したところ、16カ所の水滴全てが同じように直径240 $\mu$ m程度の円形に見えた。

その後、図9に示すように、コの字形に切った両面シール(宝酒造製、in situ PCR用シール、厚さ約150 $\mu$ m)45をカバーガラス10の端の方に貼り合わせ、この上からさらにもう一枚カバーガラスを貼り合わせた。図中、ハッチングを施した部分46は、油膜のある領域を指す。そして、シールのない部分47をマニキュアで固めて、密閉した。

こうして作製した反応容器を図4に示した台紙から剥がし、サーマルサイクラー(パーキンエルマー社製DNAサーマルサイクラー480)のヒートブロック上に載せ、94℃1分、55℃1分、72℃1分の温度サイクルを24回繰り返したのち、水滴の状態を顕

微鏡で観察した。図10は、隣接する2滴の水滴の透過微分干渉像を示す顕微鏡写真である。図の左側が中央部の方向である。左側、すなわち中央部の水滴の方が盛り上がっているように見え、水滴の量が多いことが分かる。ピントがぼけて黒く点々と見えるのはカバーガラスに挟み込んだ内部に付着した水滴であり、この水滴も中央部の方が多い。このように、全部で16カ所ある水滴のうち、周辺部にある12カ所の水滴は、中央部の4カ所の水滴と比べて量が少なくなっていた。これは、中央部の水滴に対して、周辺部の12の水滴が前述の保護用水滴の役割を果たしたためと考えられる。

次に、前記と同様にして超純水をカバーガラス上に打ち出した。ただし、塗布したオイルの量は2 $\mu$ L、重ね打ち回数は2回である。打ち終わったあと、2 $\mu$ Lのオイルを追加し、カバーをかけずにそのままサーマルサイ클ーのヒートブロック上に載せ、前記と同様の温度サイ클ーを開始した。すると、最初に94 $^{\circ}$ Cに温度が上昇した時点で油膜の液面が乱れ、水滴が空気中に露出し、蒸発してしまった。このことから、油膜の上面にカバーをかけるのが有効であることが分かる。

### 実施の形態3

極微量の水滴中で進行した反応を検出する方法としては、水滴の吸光度、蛍光、発光等の光学的変化を測定する方法が最も有力である。この場合、図11(a)に示すように、水滴の付着している基板10の表面と油膜11の上面にかけるカバー50に透明な材料を使用し、これらと垂直な方向から励起光の照射、蛍光、発光、透過光の観察を行うのが合理的である。ところが、一般的な光学セルなどを使用する場合と比べて、光路長が短く、しかも一定しないため、定量的な観察をしにくいという問題がある。

そこで、この問題の解決策として、図11(b)に示すように、水滴が付着している基板10の表面と油膜11の上面に設置したカバー50との間隔を一旦狭めて水滴13をカバー50に接触させ、そののち再び図11(c)に示すように間隔を広げる方法を採用した。これによって、水滴13が基板表面と垂直な方向に引き延ばされ、水滴13中の光路長を最初より長く、しかも一定にすることができる。

カバー50と基板10の表面の間隔を調整する機構として、最も単純な方法は、図12(a)に断面を略示するカバー50、基板10、基板とカバーとの間隔を規制するスペーサ52、53等に弾性のある部材を使用し、図12(b)に示すようにカバーに基板表面との間隔を狭めるような力を加える方法である。この力は指で加えてもよいが、精密モー



タや圧電素子などを使用して力を加えてもよい。

次に、微小液滴を基板表面とカバーガラスの両方に接触させて光路長を増大したことによる効果について、より具体的に説明する。パーキンエルマー社の「TAQMAN PCR試薬キット」を用いて溶液を調整した。まず、キットの説明書に従って、次の〔表2〕のように試薬を混合した。

表2

試薬	最終濃度
KCl	50 mM
Tris-HCl, pH 8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	200 $\mu$ M
dCTP	200 $\mu$ M
dGTP	200 $\mu$ M
dUTP	400 $\mu$ M
$\beta$ -アクチンフォワードプライマー(配列番号1)	300 nM
$\beta$ -アクチンリバースプライマー(配列番号2)	300 nM
$\beta$ -アクチンプローブ(配列番号3)	200 nM
Amp l i T a q DNAポリメラーゼ	0.25 U/ $\mu$ L
Amp E r a s e UNG	0.01 U/ $\mu$ L
ヒト男性DNA	0.2 ng/ $\mu$ L
(ヒト男性DNAは、入っているものと入っていないものの2種類を調製した)	

配列番号1 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

配列番号2 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

配列番号3 5'-(FAM)ATGCCC-X(TAMRA)CCCCATGCCATCCTGCGTp-3'

ただし、Xはリンカー部がついているヌクレオチド、pはリン酸化を示す。FAM, TAMRAは蛍光色素名である。

ヒト男性DNAが入っているもの(+)、入っていないもの(-)各300  $\mu$ Lを調製

し、それぞれ6本のチューブに50  $\mu$ Lずつ分割した。これをサーマルサイクラーに入れ、50°C 1分、95°C 1分のあと、92°C 1分、54°C 1分、72°C 2分の温度サイクルを40サイクル繰り返し、さらに72°Cで10分間反応させた。

反応終了後、(+)と(-)の溶液をそれぞれ1本のチューブに集めた。(+)と(-)の溶液それぞれ10  $\mu$ LをTE緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA pH8.0)990  $\mu$ Lに加え、蛍光分光光度計(日本分光工業製、FP-777)で蛍光スペクトルを測定した。

結果を図13に示す。励起波長は488nmである。ヒト男性DNAの入っているサンプル(+)は、入っていないサンプル(-)と比べて、520nm付近の蛍光強度が強くなっている。

(+)と(-)の溶液をそれぞれ別のモノクロ用プリンタヘッドに充填し、実施の形態1と同様にしてカバーガラス上に打ち出した。カバーガラス上に塗布したオイルはベックマン社製真空拡散ポンプ用オイル330246で、使用量は2  $\mu$ Lである。打ち出したドットパターンは、縦2ドット×横2ドットの4ドットで5回重ね打ちを行った。(+)のドット群と(-)のドット群は、互いに約0.7mm離して同一のカバーガラス上に打ち出した。

(+)の溶液と(-)の溶液を打ち出したあと、カバーガラス上に約5  $\mu$ Lのオイルを追加し、顕微鏡(オリンパス光学工業社製、1MT-2)で観察した。図14は、観察された水滴の透過顕微鏡写真である。図14の左側が(+)の溶液からなる水滴であり、右側が(-)の溶液からなる水滴である。水滴は直径約300  $\mu$ mのほぼ円形であった。次に、この2つ並んだ水滴を励起波長約480nmのB励起で蛍光観察した。図15は、図14のように並んだ(+)の水滴と、(-)の水滴の蛍光観察像を表す顕微鏡写真である。図15に示されるように、蛍光は弱く、ぼんやりとしか(+)の水滴と(-)の水滴の違いは分からなかった。

次に、(+)と(-)の溶液を同様にカバーガラス上のオイル塗布領域55に打ち出したあと、図16(a)に示すように、カバーガラス10の端部56、57に両面接着テープ(ニチバン製、セルタックCW-18)を2枚重ねて貼り付けた、その上からカバーガラスをもう一枚貼り付けた。この両面接着テープの厚さは約70  $\mu$ mであり、2枚重ね合わせると厚さ約140  $\mu$ mになる。さらに、図16(b)に示すように、テープを貼って

いないカバーガラスの端部に余分にオイル 58, 59 を追加した。

カバーガラス 10 の中央付近を指で押さえ、水滴が油膜の上のカバーガラスに付着したのを確認したあと、ゆっくり指を離した。図 16 (b) のように端部に追加したオイルのおかげで、2 枚のカバーガラスの間に気泡は入らなかった。

図 17 はこうして形成した水滴の透過顕微鏡写真であり、左側が (+) の水滴、右側が (-) の水滴である。このように、水滴は、図 11 (c) の模式図に示したように、円柱状になっていることが分かる。円柱の直径は約  $80\text{ }\mu\text{m}$  であった。B 励起で蛍光観察したところ、図 18 に示すように、(+) の水滴の方が (-) の水滴よりも強く光っている様子がはっきりと分かった。

微小液滴中の光路長を増加させるための他の方法として、水滴を付着させる基板の材料として撥水性のあるもの、あるいは撥水性のコーティングを施したものを使用した。水滴が付着する基板 61 の表面に撥水性がない場合は、図 19 (a) に略示するように基板 61 との接触面積が大きくなるため、基板表面に垂直方向の水滴内の光路長が短くなる。一方、水滴が付着する基板 62 の表面に撥水性がある場合には、図 19 (b) のように基板表面に垂直方向の水滴 64 内の光路長が長くなる。

ここでいう撥水性とは、通常使用されるガラス基板に付着した水滴の接触角に対して、より大きな接触角を有する場合をいい、撥水性のある材料としては、例えばポリプロピレン、ポリエチレンなどの透明な材料を用いることができる。また、撥水性コーティング材は多数市販されており、本発明で用いることのできる撥水性コーティング材としては、例えばシグマ社のシグマコートをあげることができる。

特開平 4-262256 号公報には、撥水性基板の上にインクジェットで吐出した液を載せる示唆があるが、これは本発明のように光路長を増大することを意図するものではない。また、米国特許第 5,474,796 号にも撥水性、親水性のパターンを作った上にインクジェットで液を載せる記載があるが、これは隣り合った液滴を空間的に分けるのが目的であり、同様に光路長を増大することを意図するものではない。

次に、水滴の付着する表面を撥水性とすることの効果を確認するため、マツナミ製顕微鏡観察用カバーガラス ( $18\text{ mm} \times 18\text{ mm}$ 、厚さ  $0.12 \sim 0.17\text{ mm}$ ) にシグマ社のシグマコートを塗布し、乾燥させ、撥水性コートを施した。その後、実施の形態 1 と同様に、図 4 に示した台紙に接着し、インクジェットで水滴を打ち出して、撥水性コートの

ある場合とない場合の水滴の様子を比べてみた。使用したオイルは、信越化学工業製シリコンオイルKF96-30とKF-50を1:1の割合で混合したもので、オイルの塗布量は撥水性コートがあるものが2 $\mu$ L、撥水性コートのないものが3 $\mu$ Lであった。インクジェットヘッドから打ち出した水滴のパターンは実施の形態1と同様にした。

顕微鏡で観察した水滴の大きさ（基板垂直方向から見た水滴の直径）は、撥水性コートのある方が40 $\mu$ m程度であったのに対し、撥水性コートのない方は100 $\mu$ m程度であった。このことから、水滴の状態が図19のようになっており、撥水性コートを設けることによって基板垂直方向の水滴内光路長を増大することができることが分かる。

なお、微小水滴中で化学反応を行うときは、複数のノズルから別々の試薬を同じ場所に吐出し、その場で混合することになる。このとき、図20(a)に示すように、微小液滴13が基板10の表面に付着していると、位置決めが容易であり、水滴（試薬）65の追加、混合が容易である。一方、図20(b)に示すように水滴15が油膜11中を漂っていると、新たな水滴（試薬）65の追加は困難である。このような試薬の追加という観点からも、微小液滴は基板表面に付着した状態で保持する必要がある。

#### 実施の形態4

##### 微量容器のPCR用加熱ホルダー(1)

従来、in situ PCR装置としては、アルミホイルでスライドガラスを包んでヒートブロック上に設置するタイプのもの（例えば、米国特許第5,538,871号明細書参照）、あるいは平坦なヒートブロックにスライドガラスを設置するタイプのもの（例えば、宝酒造TP3000）が知られている。しかし、これらのPCR装置では、前記実施の形態で用いた微量PCR用の反応容器の正確な温度制御困難である。そこで、前述の反応容器を使用して微量PCRを行う際に有用な加熱ホルダーを作製した。

図21は、本発明による反応容器の分解組立図である。図21に示すように、反応容器100は2枚の透明板101、103を中央に穴の開いた環状のスペーサ102を介して接着した構造を有する。透明板101、103の材質はガラスまたはプラスチックとすることができ、厚さは0.1~0.2mmが好ましい。スペーサ102は、ポリ塩化ビニルの両面接着テープで構成することができ、厚さ0.02mm程度が好ましい。反応容器100の外形は、例えば18mm×18mmの正方形とすることができる。

図22は、反応容器内にPCR反応液を入れた反応容器の使用状態の一例を示す上面図

である。図21に示した中央に正方形の穴が開いた正方形のスペーサ102を、下側の透明板101に接着したとき形成される凹部が、反応容器100の液体収容部として利用される。反応容器100の内部はオイルで満たされ、10 nL程度のPCR反応液の水滴104が数十個内部に点在される。PCR反応液の水滴104は、インクジェットヘッドから反応容器内に打ち込まれたものである。オイルは、PCR反応液の水滴104を打ち込む前に反応容器内に満たしておいてもよいし、PCR反応液の水滴104を打ち込んだ後に水滴104に被せるようにして満たしてもよい。その後、上側の透明板103をスペーサ102の両面接着テープ上に配置して密封することで反応容器100内に反応液が収容される。

図23は、ホルダー本体の分解組立図である。図23に示したホルダー110は、図4に示した反応容器100を6個収容することができる大きさを有し、外枠111と穴あき板112と底板113を接着して作製される。外枠111は、発泡ポリプロピレン等からなる断熱材で作られている。穴あき板112は薄い合成樹脂板からなり、図の例の場合、反応容器100が挿入される貫通穴を6個有する。底板113は熱伝導性に優れた薄いアルミニウム、銅などの金属板で作られる。外枠111の内側の側面114にはシリコンゴムが塗布され、断熱材内部へのオイルの侵入を防止している。

図24は反応容器を組み込んだホルダーの全体図、図25はその分解組立図である。図25に示すように、反応容器100をホルダー本体110の外枠111によって形成される凹部にはめ込み、その上から上蓋115をかぶせ、サーマルサイクラーのヒートブロック120の上に設置する。上蓋115は5 mm程度の厚さを有し、発泡ポリプロピレン等の断熱材で作られている。反応容器100、ホルダー本体110、ヒートブロック120の間の熱伝導性を高めるため、隙間はオイルやグリースで満たされている。また、全体の密着性を高めるため、サーマルサイクラーに設置するときは、上蓋115の上に3 kg程度のオモリを載せるのが好ましい。

こうして作製してホルダーに反応容器を収容し、温度制御特性を測定した。測定のため、反応容器にはPCR反応液を入れず、代わりに熱電対を挿入した。ホルダーをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA 480）上に設置し、92℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録

した。図26は、1サイクルの実測温度を示すグラフである。図中の温度が横に書いてある横線は、設定温度、設定時間を示す。図から明らかなように、実測温度は設定温度とほぼ一致していた。

比較のために、スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して熱電対を挿入したものを作製した。これを *in situ* 用に平板のヒートブロックを持つサーマルサイクラー（宝酒造、TP300）に設置し、92℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施して、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。使用したサーマルサイクラーの上蓋を閉めた場合と、閉めない場合について、測定を行った。

図27は上蓋を閉めた場合の測定結果を示し、図28は上蓋を閉めない場合の測定結果を示す。いずれの場合でも設定温度と実測温度に差があることが分かる。特に、上蓋を閉めなかった図28の場合に設定温度と実測温度の差が顕著であることが分かる。

また、比較のために、*in situ* PCR用のヒートブロックを使用しない場合の従来の *in situ* PCRの方法の温度制御特性を調べた。スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して、熱電対を挿入した。スライドグラスをアルミホイルで包み込んだ上で、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA480）に設置した。92℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。その結果、図29に示すように、設定温度と実測温度に差があった。

更に比較のために、*in situ* PCR用のヒートブロックを使用しない場合の従来の *in situ* PCRの方法の温度制御特性を調べた。

スライドグラス上に、ポリ塩化ビニルの両面接着テープからなるスペーサ（図21のスペーサ102に相当）を介してカバーグラスを接着し、カバーグラスとスライドグラスの隙間にシリコンオイルを充填して、熱電対を挿入した。アルミホイルで包み込み、さらに断熱材で覆ってサーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA480）に設置した。9

2℃1分、54℃1分、72℃2分の温度サイクルを実施し、デジタル温度計（横川電機、型番2575）及びペンレコーダー（グラフテック製、型番SR6512）を用いて反応容器内部の温度を記録した。

その結果、図30に示すように、かなり正確に温度制御されていた。ただし、図26と図30とを比較すると明らかなように、スライドガラスを使用せずに断熱材を直接微量反応容器にかぶせる構造を取る本実施例のホルダーを用いる方が、温度制御の正確性は優れていた。スライドガラスを使用した場合に、温度制御の正確性が劣っていたのは、スライドガラスが断熱材ほど断熱性が良くないためと考えられる。

本実施の形態によるホルダーは、本発明の微量PCR反応容器に適した形状を有する。そして、ヒートブロックと反対側の面に断熱材を使用し、スライドガラスを除去して代わりにカバーガラスを採用しており、断熱材の使用によって温度制御の正確性が高まった。また、温度制御されるべき部分はホルダーの底板113と反応容器本体100だけなので、熱容量が小さく、また、熱伝導が良好なため、サーマルサイクラーの制御パラメーター（ヒートブロックの熱容量、熱伝導率に基づき、通常は変更できない）を変更しなくても制御が可能のため、どのようなサーマルサイクラーを使用しても正確な温度制御が期待できる。

なお、反応容器100は、ときどきシールが不完全で、内部に空気が混入することがあるが、本発明のホルダーを用いると、ホルダー110の全体の底にオイルが満たされるため、反応容器のシールが不完全な場合でも、反応容器内に空気が混入することを防止できる。

本実施の形態で説明したホルダーの変形例として、上面が平板のサーマルサイクラーを使用する場合、底板113を使わず、穴あき板112の下面をヒートブロックに直接粘着させるようにしてもよい。この場合、何回も粘着、剥離可能なことが望ましい。全体の各部品の密着性を高めるため、上部におもりをのせる代わりに、万力のようなものを使って、サーマルサイクラー120とホルダー110を締め付けてもよい。

#### 実施の形態5

##### 微量容器のPCR用加熱ホルダー（2）

本発明の反応容器を保持するホルダーの他の例について説明する。本実施の形態のホルダーは、スライドガラスと同一サイズを有するのが特徴である。このホルダーの使用によ

り、図21に示した本発明の微量PCR用反応容器を一般的な in situ PCR用サーマルサイクラーで利用することが可能となる。

図31は、ホルダーの分解組立図である。ホルダー本体130は、底板132と穴あき板131からなり、両者を接着して構成される。底板132及び穴あき板131は、熱伝導性に優れた金属、あるいは反対に断熱材などで作られる。穴あき板131は、反応容器が収まる穴を複数個有する。ホルダー130の全体寸法は、in situ PCRで使用される顕微鏡用スライドガラスと同一の外寸(75.9mm×26.1mm×1.1mm)を有する。

図32は、反応容器を組み込んだホルダーの分解組立図である。反応容器100は、ホルダー本体130のくぼみにはめ込んで固定される。反応容器100をホルダー130に装着した後、本体の上面に再剥離が容易な接着剤あるいはマジックテープ等によって固定板133を着脱可能に取り付ける。固定板133は、熱伝導性に優れた薄い金属からなり、反応容器100をホルダー本体130に固定する役割を有する。また、ホルダー本体130、反応容器100、固定板133の間の熱伝導性を高めるため、隙間をオイルあるいはグリースで満たす。サーマルサイクラーに設置するときには、固定板133の側をヒートブロックに接触させるようにする。

本実施の形態のホルダーを使用すると、保管の際もスライド用の保管箱が利用できて便利である。また、固定板133は必ずしも必要ではなく、ホルダー本体130と反応容器100が適当な方法で固定されていればよい。

#### 実施の形態6

インクジェットヘッドとして、パソコン用インクジェットプリンタ(MJ500C、セイコーエプソン製)のモノクロ印刷用ヘッドを使用し、インクジェットによって微量の試薬を混合し、10nLのPCRを行った。PCR反応を行うのに先立ち、(1)インクジェットヘッド内部のコーティング、(2)マイクロリットルスケールでの反応容器コーティング、(3)マイクロリットルスケールでの酵素濃度、(4)反応容器表面の水滴付着性の改善、(5)水滴溶出防止のための反応容器内部厚さ、(6)PCR反応促進のための酵素の増量について検討した。

##### (1) インクジェットヘッド内部のコーティングの検討

インクジェットヘッド内部の酵素の吸着を防止するため、コーティングを検討した。P



CRが進行したかどうか光学的に検出するためのシステムとして、タックマンシステム（パーキンエルマー製）を利用することにした。次の〔表3〕のようにPCR反応液を調製した。

表3

ヒトゲノムを鋳型にしたタックマンPCRの組成

試薬	最終濃度
KCl	50 mM
Tris-Cl, pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	0.2 mM
dCTP	0.2 mM
dGTP	0.2 mM
dTTP	0.2 mM
β-アクチンフォワードプライマー（配列番号1）	0.3 μM
β-アクチンリバースプライマー（配列番号2）	0.3 μM
β-アクチンプローブ（配列番号3）	0.2 μM
アンプリタック DNAポリメラーゼ	0.1 U/μL
アンブイレース UNG	0.01 U/μL
ヒト男性ゲノムDNA （ベーリンガー・マンハイム社製）	1 ng/μL

この反応液を、ヘッドの内部に充填し、パソコン（PC9801ns、日本電気製）に接続されたプリンタに取り付け、カバーガラス上に噴射した。その後、ピペットで0.5 mLチューブに移した。これを繰り返し、合計40 μLの反応液を集め、4本の0.5 mLチューブに小分けし、サーマルサイクラー（DNA480、パーキンエルマー製）にセットし、50℃2分、95℃10分のあと、92℃1分、54℃1分、72℃2分を40サイクル繰り返し、更に72℃10分で反応させる温度サイクルにかけた。

反応終了後、10 μLの反応液に、TE緩衝液（pH8.0）を990 μL加え、蛍光分光光度計（FP777、日本分光製）で、蛍光スペクトルを測定した。励起波長は48

8 nmにした。測定の結果、4つのサンプルいずれからも図33のような蛍光スペクトルが得られた。図33を見ると、蛍光色素FAM由来の520 nmのピークが、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークよりも小さい。これは、PCR反応が進行しなかったことを示している。原因は、ヘッド内部への酵素の吸着によるものと考えられた。

そこで、酵素の吸着を防止するため、反応液を充填する前に、5%ウシ血清アルブミン水溶液をインクジェットヘッド内部に満たし、室温で一晩放置し、そのあと、同様の実験を行った。蛍光スペクトルを測定したところ、実験した2つのサンプルいずれからも、図34に示す蛍光スペクトルが得られた。図34を見ると、蛍光色素FAM由来の520 nmのピークが、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークよりも大きい。これはPCR反応が進行したことを示していた。これらの検討により、ヘッド内部の前処理として、ウシ血清アルブミンによるコーティングが有効なことが示された。

## (2) マイクロリットルスケールでの反応容器コーティングの検討

続いて、反応容器への酵素の吸着を防止するため、コーティングの検討をおこなった。市販の顕微鏡用カバーガラス（マツナミ製）にシグマコート（アルドリッチジャパン製）を塗布、乾燥し、表面をシリコンコートした。そして、図21煮染めしたように反応容器を作成した。カバーガラスからなる透明板101、103の寸法は18 mm×18 mm、スペーサ102として用いた市販の in situ PCR用両面シール（宝酒造製）の寸法は18 mm×18 mm、中央の正方形の穴は、10 mm×10 mm、厚さは0.2 mmである。

下側カバーガラス101と、シール102を張り合わせたところに、前記〔表3〕の組成のPCR反応液20  $\mu$  Lを内側に入れ、そのあと、上側カバーガラス103を張り付けた。これを図25に示したように加熱ホルダーに入れ、サーマルサイクラーに仕掛けて、反応させた。その後、反応容器を破壊して、内部の反応液を取り出し、TE緩衝液（pH 8.0）で薄めて、蛍光スペクトルを測定した。図35はカバーガラス101、103をシリコンコートした場合、図36はシリコンコートしなかった場合の蛍光スペクトルである。カバーガラス101、103をシリコンコートした場合だけ、PCRが進行していたことが分かる。

## (3) マイクロリットルスケールでの酵素濃度の検討

シリコンコートした反応溶液において必要な酵素濃度について検討した。反応液の組成は次の〔表4〕の通りであるが、DNAポリメラーゼの濃度を変化させた。通常チューブ

内で反応するときと比べて、1倍 ( $0.025 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、2倍 ( $0.050 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、5倍 ( $0.125 \text{ U}/\mu\text{L}$ )、10倍 ( $0.25 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) にし、これまでと同様に、サーマルサイクラーにかけた後、TE緩衝液で希釈して、蛍光スペクトルを測定した。

表4

## ターゲットDNA取得のためのPCRの組成

Takara Ex Taq (宝酒造製)	12.5 $\mu\text{L}$ (62.5 U)
10 $\times$ Ex Taq 緩衝液 (宝酒造製)	250 $\mu\text{L}$
dNTP混合液 (宝酒造製)	200 $\mu\text{L}$
ヒト男性ゲノムDNA	
(ベーリンガー・マンハイム社製)	25 $\mu\text{L}$ (250 ng)
プライマーF3	25 $\mu\text{L}$ (2.5 nmol)
プライマーR3	25 $\mu\text{L}$ (2.5 nmol)
滅菌水	1962.5 $\mu\text{L}$

図37は、測定された蛍光スペクトルを示す。蛍光色素FAM由来の520 nmのピークと、蛍光色素TAMRA由来の580 nmのピークを比べると、酵素量が2～5倍で一定になり、PCRが進行していることが分かる。また、酵素濃度を通常チューブ内で反応するときと比べて4倍 ( $0.1 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) にし、4個の反応容器に充填して反応したところ、いずれも、図38のような蛍光スペクトルが得られた。

これらの結果から、20  $\mu\text{L}$ スケールで、シリコンコートした反応容器を用いる場合、通常チューブ内の濃度の4倍 ( $0.1 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) 以上の酵素が必要であることが分かった。

## (4) 反応容器表面の水滴付着性の改善

前述のように、反応容器表面への酵素の吸着を防止するためには、反応容器の内面にシリコンコートを実施する必要がある。しかし、シリコンコートを施した表面は、撥水性が高いため、インクジェットノズルで微小水滴を噴射すると、水滴が容器の表面から飛び跳ね、一定の量を再現性良く分注することが困難である。そこで、反応容器表面の水滴付着性を改善するため、シリコンコートした上に、更にウシ血清アルブミンをコーティングすることにした。

コーティング処理として、5%ウシ血清アルブミン水溶液を染み込ませた実験用ティッ

シュペーパー（キムワイプ、十條キンバリー製）でカバーガラスの表面を拭いた後、再びきれいに拭き取った。処理後のカバーガラスは、見かけは処理前と変わらないが、水滴の付着性が改善されており、インクジェットノズルにより、再現性良く水滴を分注することができた。

#### （５）水滴溶出防止のための反応容器内部厚さの検討

反応容器の下面となるカバーガラスを、プリンタに設置するため、図４で説明したように台紙２０に張り付けた。台紙２０の材質はプラスチック製のシートで、大きさは７０mm×１２０mm、斜線で示した部分２１（大きさ１０mm×１０mm）が観察用に切り抜かれており、二点差線で示した部分２２にカバーガラスを接着した。この台紙２０をプリンタに給紙し、カバーガラス上に水滴を分注した。例えば、１０nLの水滴を分注するためには、７ドット×７ドットの正方形を５回重ねうちする。１ドットの液量は、約４０pLであるので、 $7 \times 7 \times 5 = 245$ ドットの液量は、 $245 \times 40 = 9800$  pL、つまり、約１０nLとなる。

前記〔表４〕の組成の反応液を、インクジェットノズルから約１０nL（２４５ドット）を分注し、分注後、直ちに、オイル（シリコンオイルKF96-50、粘度５０cp、信越化学製）を上からかぶせ、スぺーサ、上板カバーガラスを順に取り付けて、台紙上に図２１のような反応容器を組み立てた。スぺーサとして、市販のin situ PCR用両面シール（宝酒造製）を使用したもので、反応容器内面の厚さは約２００μmになった。その後、反応容器を台紙から切り離し、図２４、図２５で説明したホルダーに取り付け、５０℃２分、９５℃１０分のあと、９２℃１分、５４℃１分、７２℃２分を４０サイクル繰り返し、更に７２℃１０分で反応させる温度サイクルをかけてPCR反応をおこなった。

反応終了後、蛍光顕微鏡（BX60、オリンパス光学製）で観察した。ダイクロイックミラーユニットは、WIBキューブで、励起光が４６０～４９０nm、蛍光が５１５nm以上であった。観察の結果、オイル中の反応液の水滴の大きさが、温度サイクル開始前の約半分になっていた。これは、高温により、水滴がオイル中に溶出したためと思われる。水滴の蛍光評価も、蛍光プローブの濃度が大きく変化しているため、困難であった。

そこで、スぺーサとして、厚さ５０μmのポリ塩化ビニル製シール（加藤紙工製）を使用した。下記の〔表５〕の反応液の組成で、同様の実験を行ったところ、水滴の大きさは変化なく、溶出は起こっていなかった。これは、反応容器の内部厚さが大幅に薄くなった

ため、オイル全体の体積が減ったこと、オイルと水滴の界面の面積が減少したことによると考えられた。しかし、水滴の蛍光は、温度サイクル前と変化がなく、PCRは進行しなかったと考えられた。

表5

試薬	最終濃度
KC1	50 mM
Tris-C1, pH8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
dATP	0.2 mM
dCTP	0.2 mM
dGTP	0.2 mM
dTTP	0.2 mM
β-アクチンフォワードプライマー (配列番号1)	0.3 μM
β-アクチンリバースプライマー (配列番号2)	0.3 μM
β-アクチンプローブ (配列番号3)	0.2 μM
アンプリタック DNAポリメラーゼ	0.1 U/μL
(通常スケールのチューブの場合の4倍の濃度)	
アンピレース UNG	0.01 U/μL
ターゲットDNA (配列番号4)	1 ng/μL

さらに、次のような方法で加熱時のオイル中への水滴の溶出量を測定した。

(a) 前述の方法と同様にして、インクジェットプリンタから245ドット (10 nL) の超純水をカバーガラス表面に噴出し、水滴の上にマイクロピペットでオイルを被せた。カバーガラスにロの字型スペーサ (厚さ50 μm) を1~3枚接着し、更にその上からもう1枚のカバーガラスを接着した。このようにして、10 nLの超純水をオイルで満たされた反応容器の内部に封入した複数のサンプルを用意した。反応容器内部の厚さは、ロの字型スペーサ1枚の厚さが50 μmなので、スペーサ1枚の時は50 μm、2枚の時は100 μm、3枚の時は150 μmである。オイルとしては、ミネラルオイル (M5904, シグマアルドリッチジャパン) とシリコンオイル (KF96-50, 信越化学) を使用し

た。

(b) 反応容器内の水滴を倒立顕微鏡（オリンパス、IMT-2）で観察し、写真を撮影した。

(c) 続いて、反応容器をホルダー内に格納し、サーマルサイクラーに設置し、反応容器に次の温度サイクルを与えた。

50℃2分、95℃10分 1サイクル

92℃1分、54℃1分、72℃2分 40サイクル

72℃10分 1サイクル

(d) 温度サイクル終了後、再び反応容器内の水滴の顕微鏡写真を撮影した。水滴の顕微鏡写真をスキャナでパソコンに読み込み、画像解析ソフト（NIM Image, National Institute of Health, USA）で水滴の大きさを測定した。反応容器内部の水滴を顕微鏡で観察すると、2枚のカバーガラスに挟まれた円柱状の形状だった。温度サイクルの前後で、反応容器内部の厚さは変わらないので、顕微鏡で観察した水滴の平面的大きさが水滴の体積に比例していると考えられる。

(e) 温度サイクル前後の水滴の大きさを比較し、水滴のオイル中への溶出率を算出した。結果を下記の表6に示す。

表6

スぺーサの枚数	1	2	3
容器内部の厚さ (μm)	50	100	150
ミネラルオイル 溶出率 (%)	13.8	16.8	27.7
標準偏差 (%)	15.7	23.1	16.0
サンプル数	8	8	7
シリコンオイル 溶出率 (%)	-0.8	33.6	77.5
標準偏差 (%)	25.5	11.8	2.7
サンプル数	5	5	4

表6において、スぺーサの枚数が1枚でシリコンオイルを使用したときの溶出率がマイナスになっているのは、容器の撓みに基づく実験上の誤差である。表6から、オイル中への水滴の溶出は、容器内部の厚さが厚いほど多く、特に厚さが100μmを超えると顕著

である。従って、溶出防止のためには容器内部の厚さを100 $\mu$ m以下とするのが好ましい。

#### (6) PCR反応促進のための酵素の増量の検討

反応液量を微量化してゆくと、体積あたりの表面積が増加し、反応液の表面に酵素が吸着し、反応液中の酵素活性が減少すると考えられる。そこで酵素を増量し、微量PCRを検討した。

下記の〔表7〕に示す組成の反応液を使用した。酵素量は、通常スケールのチューブの場合の20倍であった。インクジェットノズルから約10nL（245ドット）を分注し、反応容器を組み立てた。スぺーサとして、厚さ50 $\mu$ mのポリ塩化ビニル製シール（加藤紙工製）を使用した。オイルは信越化学製シリコンオイルKF96-50、粘度50cPを使用した。

表7

試薬	最終濃度
KCl	50mM
Tris-Cl、pH8.3	10mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5mM
dATP	0.2mM
dCTP	0.2mM
dGTP	0.2mM
dTTP	0.2mM
$\beta$ -アクチンフォワードプライマー（配列番号1）	0.3 $\mu$ M
$\beta$ -アクチンリバースプライマー（配列番号2）	0.3 $\mu$ M
$\beta$ -アクチンプローブ（配列番号3）	0.2 $\mu$ M
アンプリタック DANポリメラーゼ （通常スケールのチューブの場合の20倍の濃度）	0.5U/ $\mu$ L
アンピレース UNG	0.01U/ $\mu$ L
ターゲットDNA（配列番号4）	1ng/ $\mu$ L

50℃2分、95℃10分のあと、92℃1分、54℃1分、72℃2分を40サイクル繰り返し、更に72℃10分で反応させる温度サイクルをかけて、蛍光顕微鏡で観察した。観察の結果、温度サイクルをかけたサンプル(+)と、かけないサンプル(-)を比べると、はっきりと蛍光の変化が観察された。(+)は明るい緑色、(-)は赤っぽい黄色に見えた。この蛍光色の違いは、通常のチューブでタックマンPCRをした場合の、PCRが進行した場合としなかった場合の蛍光スペクトルの違いに対応していた。(+)の水滴の内部では、PCRが進行したと考えられる。

(+)と(-)の反応容器を重ね合わせ、両方の水滴を一枚の顕微鏡写真に写した。フィルムはカラーライドフィルム(エクタクロームダイナEX、ISO100、コダック製)を使用した。現像したフィルムをフィルムスキャナー(クイックスキャン35、ミノルタ製)でパソコンに取り込み、画像解析ソフト(フォトショップ、アドベ製)で解析した。2つの水滴の蛍光画像の中の任意の30点をとって、赤(R)、緑(G)、青(B)に色分解した値を求め、R+G+Bに対する、RとGの割合をプロットしたのが図39である。(+)と(-)がはっきり異なる蛍光を発していることが分かる。

#### (7) 実験例

以上の検討により、次の条件でPCR反応を行うのが有利であることが判明した。そこで、この条件下でPCR反応を行った。

- (a) 反応溶液のオイル中への溶出を防止するため、内面厚さ50μm以下の薄型反応容器を使用(構造が簡単で安価)
- (b) 酸素の吸着防止と水滴の飛散防止を両立させた容器表面コーティング
- (c) 酸素の増量によるPCR反応の促進

10ナノリットルの微量PCRのための鋳型DNAとして、ヒトのβ-アクチン遺伝子の一部を選んだ。この遺伝子の塩基配列は、ナカジマら、*プロシーディング・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス*、82巻、6133~6137頁(1985年)に示されている。このうち、2058番目から2552番目の塩基配列、長さ495bpの部分(配列番号4)を、ゲノムDNAから通常反応スケールのPCRで取得をすることにした。

配列番号4の領域の両端にあたる、プライマーF3(配列番号5)(サワディーテクノロジー製)、プライマーR3(配列番号6)(サワディーテクノロジー製)を設計した。



〔表4〕のPCR反応液の調製を行った。反応液の全体の液量は2.5 mLとした。これを50  $\mu$ Lずつ48本の0.5 mLチューブに小分けし、サーマルサイクラー（DNA 480、パーキンエルマー製）にセットし、94℃1分、65℃1分、72℃1.5分が30サイクル、72℃2分が1サイクルからなる温度サイクルにかけた。

プライマーF3 配列番号5 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGCT-3'

プライマーR3 配列番号6 5'-AATGAGGGCAGGACTTAGCTTC-3'

反応終了後、プライマー等を除去するため、全ての液を一つに集め、限外濾過で精製した。チューブ式限外濾過膜（マイクロコン1000、アミコン製）6本に小分けし、遠心分離器で、500 G、24分で濾過した。さらに、各チューブにTE緩衝液（pH 8.0）300  $\mu$ Lを加え、遠心分離器で、500 G、15分で濾過し、洗浄した。洗浄は2回行った。さらに各チューブにTE緩衝液（pH 8.0）10  $\mu$ Lを加え、限外濾過膜上に残った精製サンプルを溶解した。図40は、0.8%アガロースゲル電気泳動による分析結果である。図40の各レーンは各々次の試料の泳動結果を示している。

レーン1：分子量マーカー $\phi$ X174/HincII（2.6  $\mu$ g）

レーン2：限外濾過前反応液（10  $\mu$ L）

レーン3：洗浄後の液（1回目）（10  $\mu$ L）

レーン4：洗浄後の液（2回目）（10  $\mu$ L）

レーン5：精製後サンプル（10  $\mu$ L）

レーン2では、PCRにより一本のバンドが、増幅されていることがわかる。このバンドの位置は、レーン1の分子量マーカーの495 bpの位置と同じであり、目的のバンド（長さ495 bp）であると判断される。レーン2の下の方に薄く見えるバンドは、プライマー等であり、限外濾過で精製した後のレーン5では除かれていた。このようにして、本発明の反応容器を用いて微量PCRが可能であることが示された。

ここでは、一つの反応容器の中に一つの反応液の水滴がある状態でPCRを行う例について説明したが、実際には、一つの反応液の水滴の直径は数百 $\mu$ mであるため、10 mm  $\times$  10 mmの反応容器の内部には、数十個の水滴を並べることができる。水滴を多数並べることにより、同時に多種類の反応を実行可能である。また、同じ種類の反応を多数実行

することにより、PCRの量子化によるターゲット濃度の定量も可能となる。また、ここでは、単一のノズルから既に混合された反応液を噴射したが、別々の試薬を別々のインクヘッドノズルから噴射して、蓋を閉めていない反応容器中反応液同士を結合させて混合することも可能である。

インクジェットから試薬を噴射して混合するとき、噴射した液が水滴に突入するとき液が飛び散る場合がある。このような場合、水滴の上部に油膜を形成しておき、その油膜を通して試薬を油膜底部に固定されている水滴中に打ち込んで混合するようにすると、油膜によって噴射液が水滴に到達する前に速度が弱まる効果、及び油膜の存在によって水滴から飛沫が飛び散りにくくなる効果によって液の飛散が防止される。

本実施の形態では、オイルにはシリコンオイルを使用した。しかし、水滴のオイル中への溶出を防止するというために、フッ素系オイルを使用してもよい。フッ素系オイルとしては、例えば、フロリナート（住友スリーエム製）、USL完全フッ素（井内盛栄堂製）があげられる。パラフィンオイル、シリコンオイルの水分含量が100ppm以上であるのに対し、フッ素系オイルでは、10ppm程度なので、オイル中への水滴の溶出の大幅な低減が期待できる。

また、本実施の形態では、10nLの水滴を分注したあとに、オイルを被せたが、オイルを容器表面に薄く塗った後に、水滴を分注することもできる。特に、液量が微量になったり、必要な試薬を分注する合計の時間が長くなる場合（例えば多数のサンプルを、並列処理する場合）は、後者のオイルを先に塗布する方法のほうが空気中への蒸発による液量の変動を防止するために望ましい。

PCRの進行状況を光学的に検出する方法はタックマン以外にも、それらを利用してもよい。例えば、蛍光エネルギー移動を利用したアンブリセンサーシステム（フナコシ製）、エチジウムブロミド等のインターカラーを利用した方法（特開平5-184397号公報）、蛍光偏光の変化を利用した方法（特開平7-23800号公報）などを利用することができる。光学的検出方法以外には、MALDI質量分析の利用も考えられる。反応終了後、反応容器の一方の蓋をはがし、MALDI用マトリックス試薬の追加など、必要な前処理を行って多数の微量なPCR産物の分子量を正確に測定し、点変異や、トリプレットリピートなどの繰り返し数を正確に検出することも可能である。

産業上の利用可能性

本発明によると、極微量の溶液を蒸発させることなく長時間安定に保持することができ、インクジェット法などによって吐出された極微量の溶液による化学反応が可能となる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

TCACCCACAC TGTGCCCATC TACGA

25

配列番号 : 2

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

CAGCGGAACC GCTCATTGCC AATGG

25

配列番号 : 3

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

ATGCCCCCCC CATGCCATCC TCGGT

25

配列番号 : 4

配列の長さ : 495

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Homo sapiens

株名 :

配列

CATGTACGTT GCTATCCAGG CTGTGCTATC CCTGTACGCC TCTGGCCGTA CCACTGGCAT	60
CGTGATGGAC TCCGGTGACG GGGTCAOCCA CACTGTGCC ATCTACGAGG GGTATGCCCT	120
CCCCATGCC ATCCTGCGTC TGGACCTGGC TGGCCGGGAC CTGACTGACT ACCTCATGAA	180
GATCCTCACC GAGCGCGGCT ACAGCTTCAC CAACACGGCC GAGCGGGAAA TCGTGCGTGA	240
CATTAAGGAG AAGCTGTGCT ACGTCGCCCT GGACTTCGAG CAAGAGATGG CCACGGCTGC	300
TTCCAGCTCC TCCCTGGAGA AGAGCTACGA GCTGCCTGAC GGCCAGGTCA TCACCATGG	360
CAATGAGCGG TTCCGCTGCC CTGAGGCACT CTTCCAGCCT TCCTTCCTGG GTGAGTGGAG	420
ACTGTCTCCC GGCTCTGCCT GACATGAGGG TTACCCCTCG GGGCTGTGCT GTGGAAGCTA	480
AGTCCTGCCC TCATT	495

配列番号 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

CATGTACGTT GCTATCCAGG CT

22

配列番号 6

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

AATGAGGGCA GGACTTAGCT TC

22

## 請求の範囲

1. 基板上に微小液滴を保持する方法であって、前記微小液滴を前記基板表面に被覆された前記微小液滴と2相に分離する液体層中で前記基板表面に接触させて保持することを特徴とする微小液滴の保持方法。
2. 前記微小液滴は水性であり、前記基板表面に被覆された液体層は油性であることを特徴とする請求項1記載の微小液滴の保持方法。
3. 前記微小液滴を、前記基板表面に被覆された液体層の表面から打ち込むことを特徴とする請求項1又は2記載の微小液滴の保持方法。
4. 前記基板表面は撥水性を有することを特徴とする請求項1、2又は3記載の微小液滴の保持方法。
5. 前記液体層表面をカバーで覆うことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の微小液滴の保持方法。
6. 前記微小液滴の近くの前記液体層中に他の水性液体を保持することを特徴とする請求項5記載の微小液滴の保持方法。
7. 前記微小液滴は前記カバーにも接触していることを特徴とする請求項5又は6記載の微小液滴の保持方法。
8. 微小液滴を基板表面に被覆された前記微小液滴と2相に分離する液体層中で前記基板表面に接触させて保持するとともに前記液体層表面をカバーで覆い、前記微小液滴中で反応を行わせることを特徴とする反応方法。
9. 前記微小液滴はDNAを含む水性液滴であり、前記基板表面に被覆された液体層は油性であることを特徴とする請求項8記載の反応方法。
10. 前記微小液滴の接触部位は酵素吸着防止剤を有することを特徴とする請求項9記載の微小液滴の反応方法。
11. 前記微小液滴の接触部位はウシ血清アルブミンコート有することを特徴とする請求項9記載の微小液滴の反応方法。
12. 前記基板表面に被覆された液体層は、厚さが100  $\mu$ m以下であることを特徴とする請求項8又は9記載の反応方法。
13. 透明な下板と、厚さ0.05 mm以下のスペーサと、透明な上板とからなり、スペーサで囲まれた領域に溶液を収容することを特徴とする反応容器。

- 1 4. 前記スペーサは両面接着テープからなることを特徴とする請求項 1 3 記載の反応容器。
- 1 5. 溶液との接触部位はウシ血清アルブミンコートを有することを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載の反応容器。



図 1

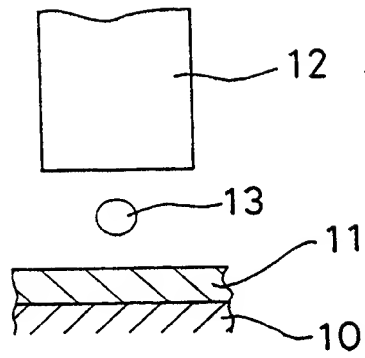


図 2

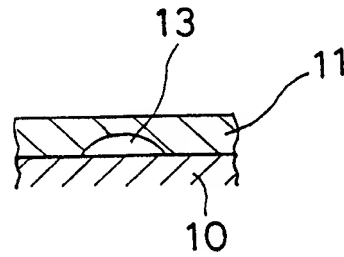


図 3

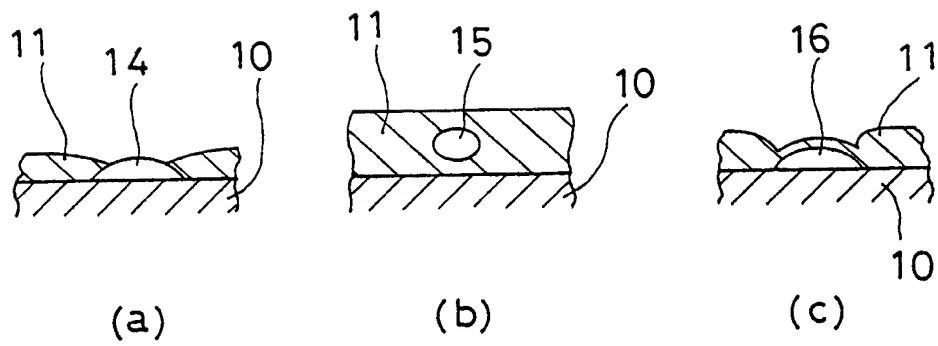


図 4

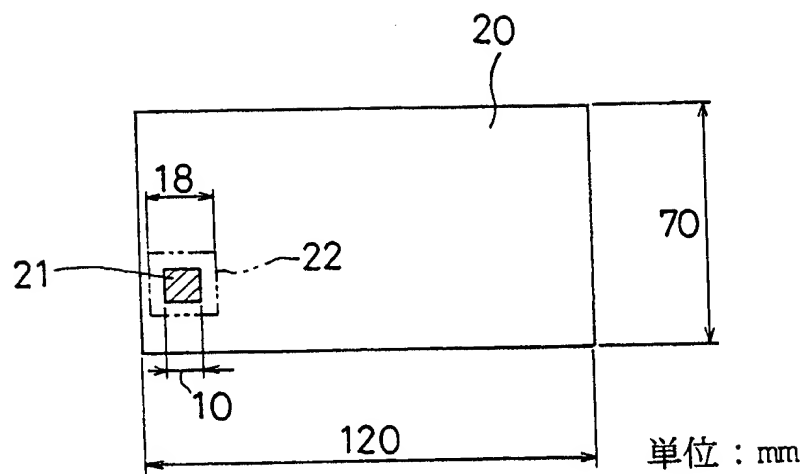


図 5

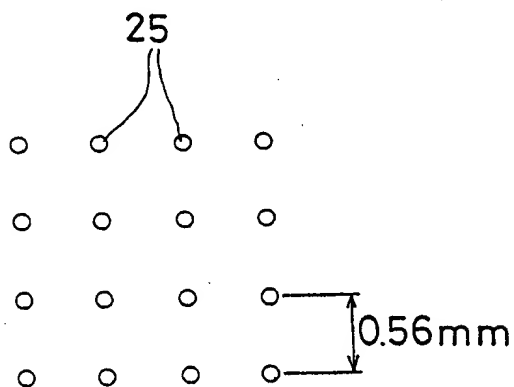


図 6

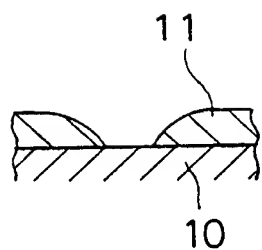


図 7

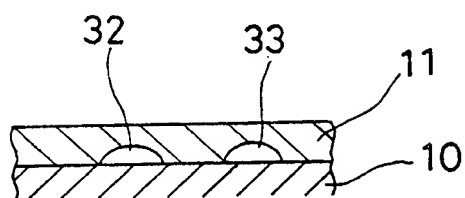


図 8

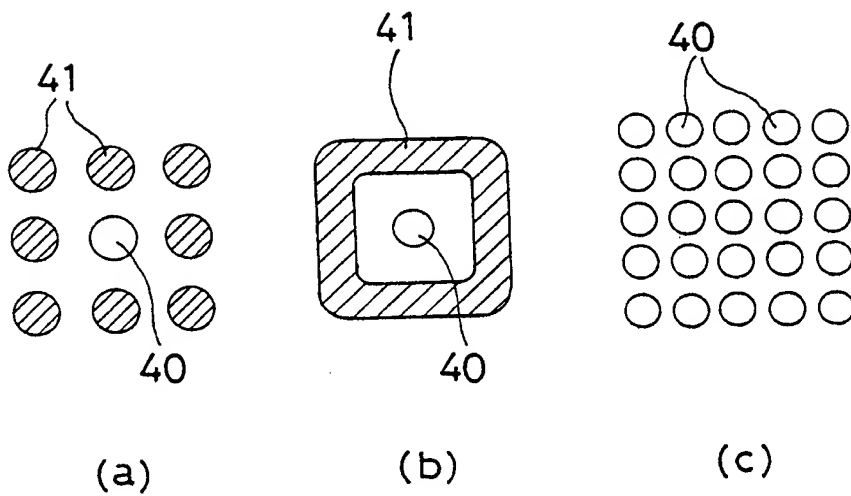


図 9

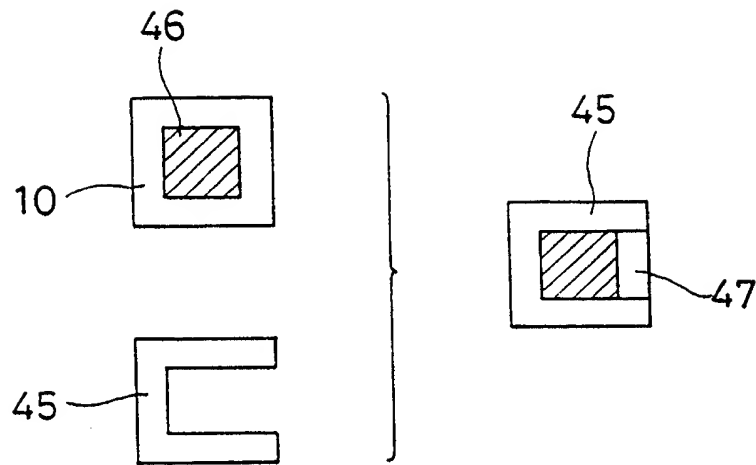


図 10

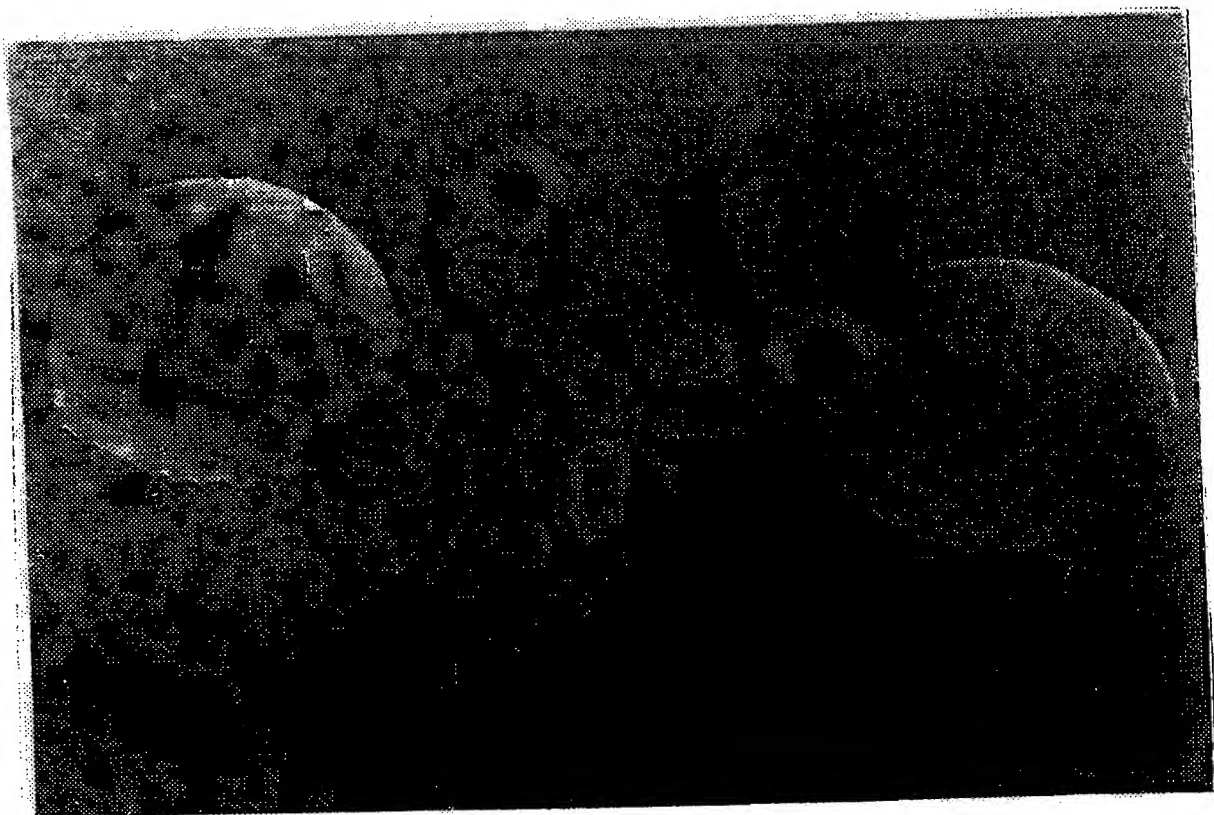


図 1 1

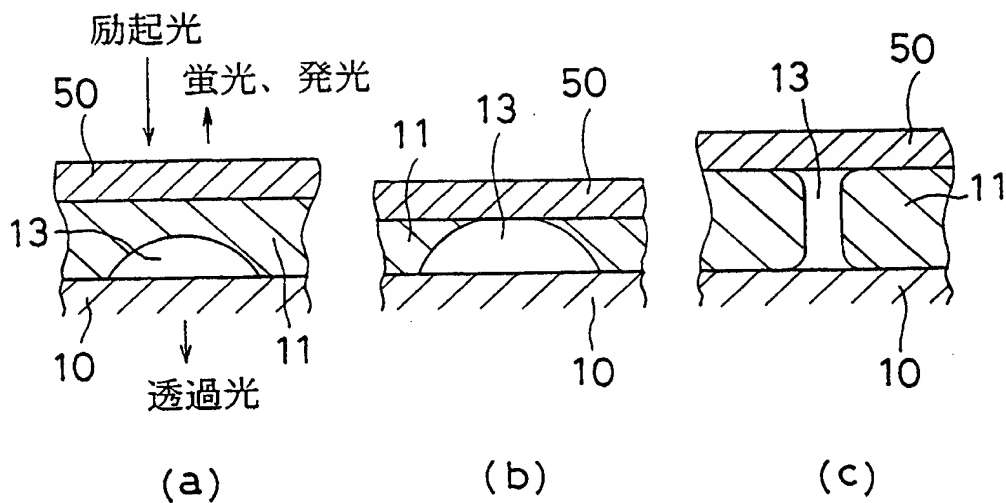


図 1 2

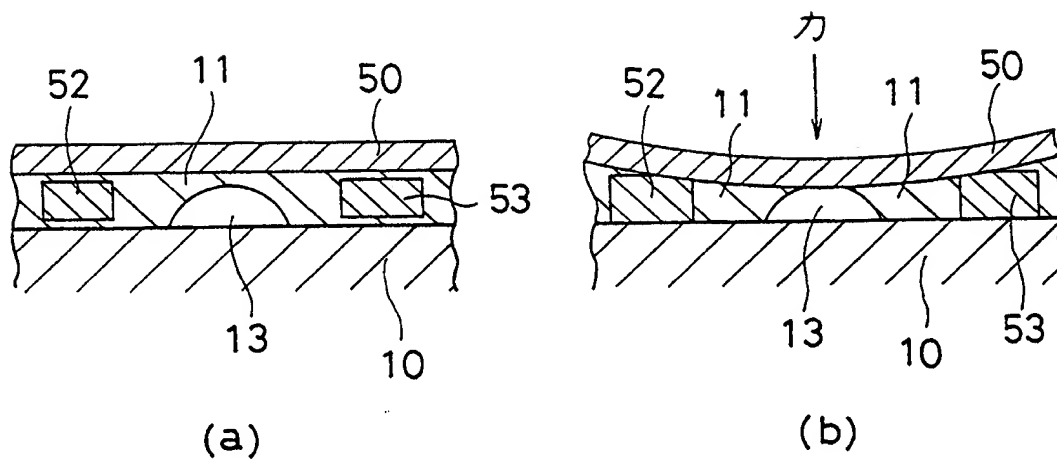


図 1 3

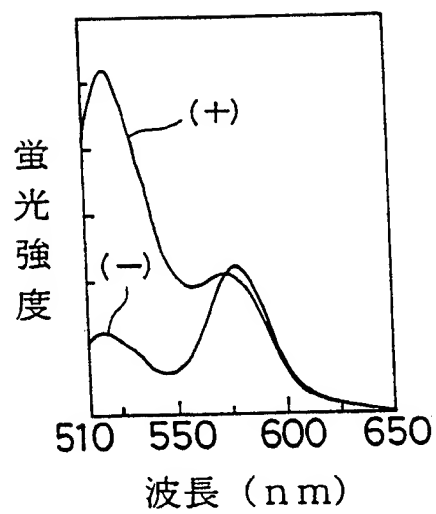


図 1 4

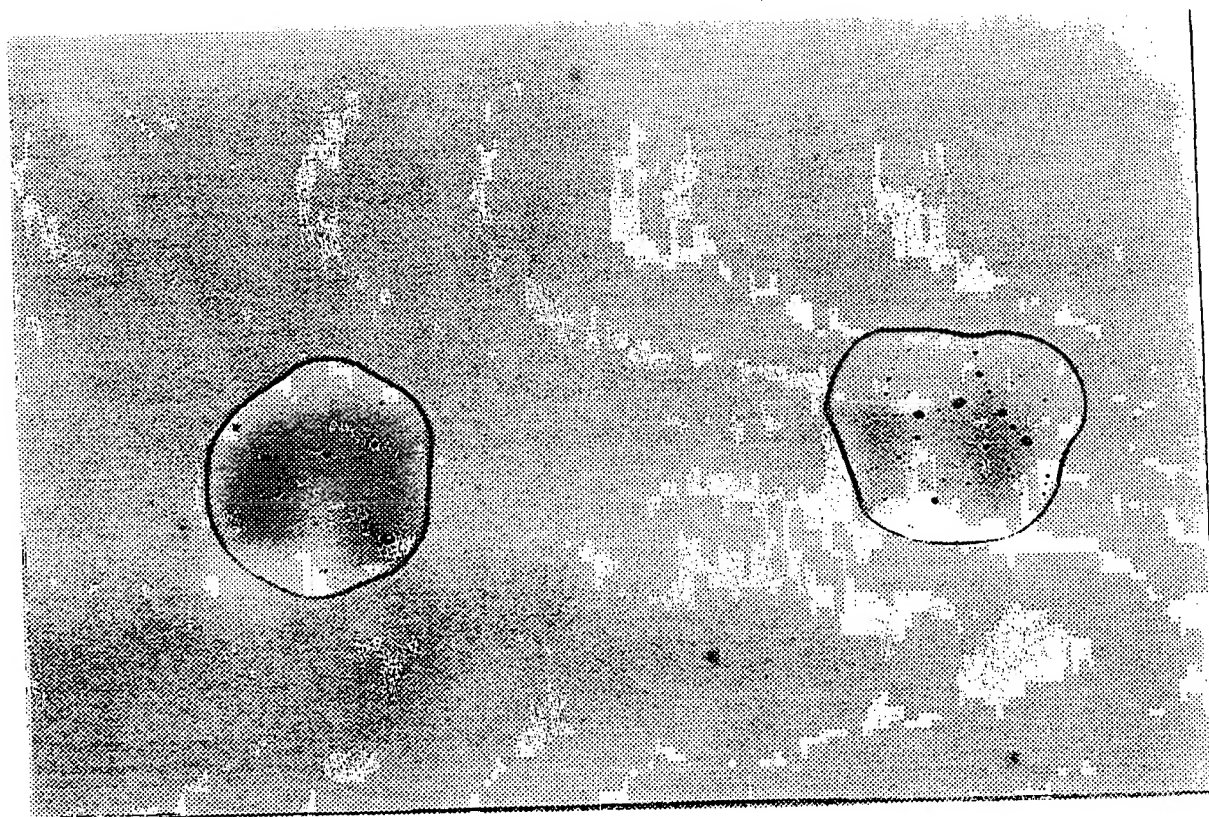




図 15

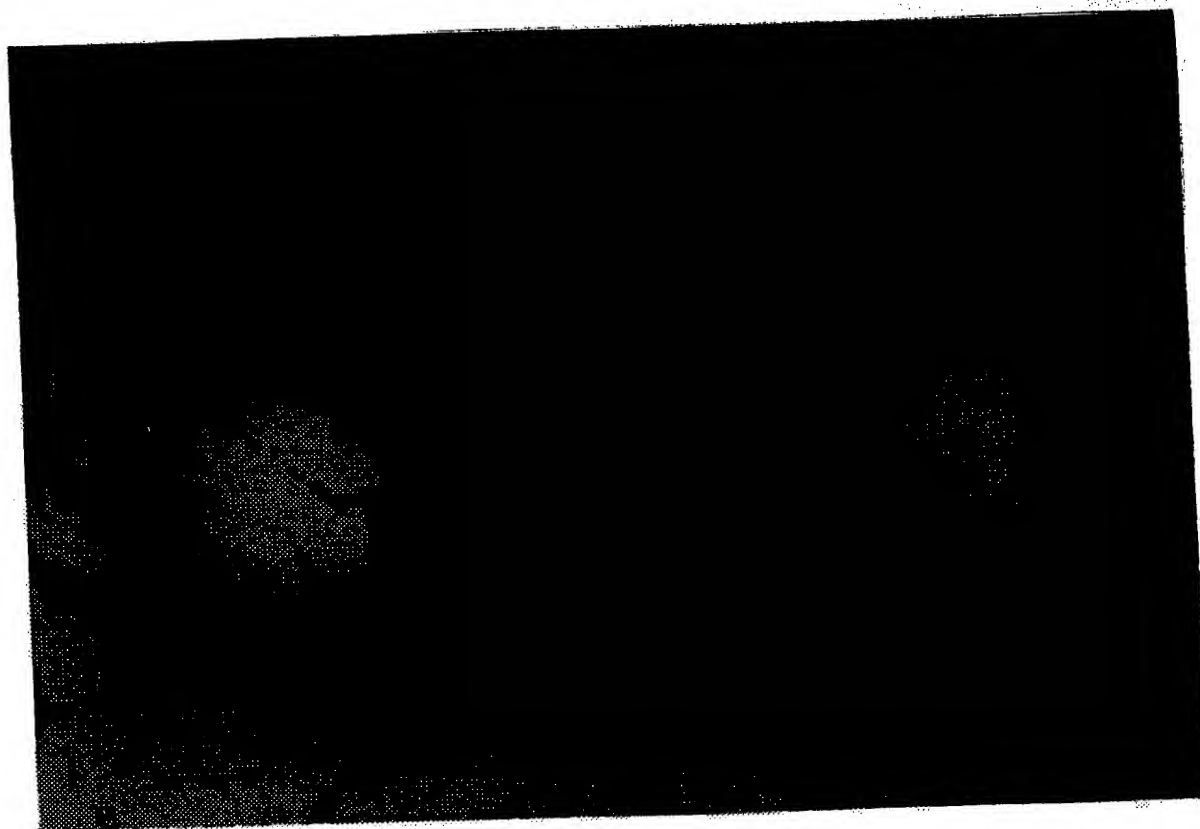


図 16

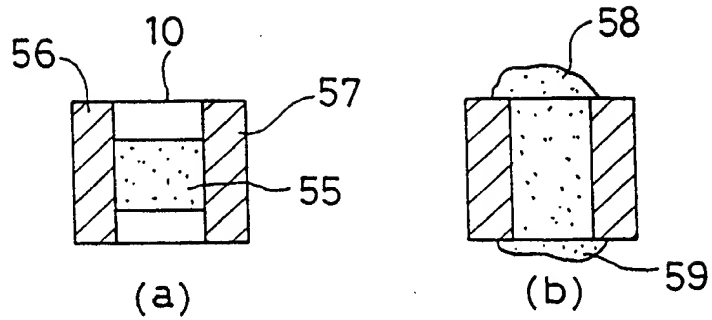
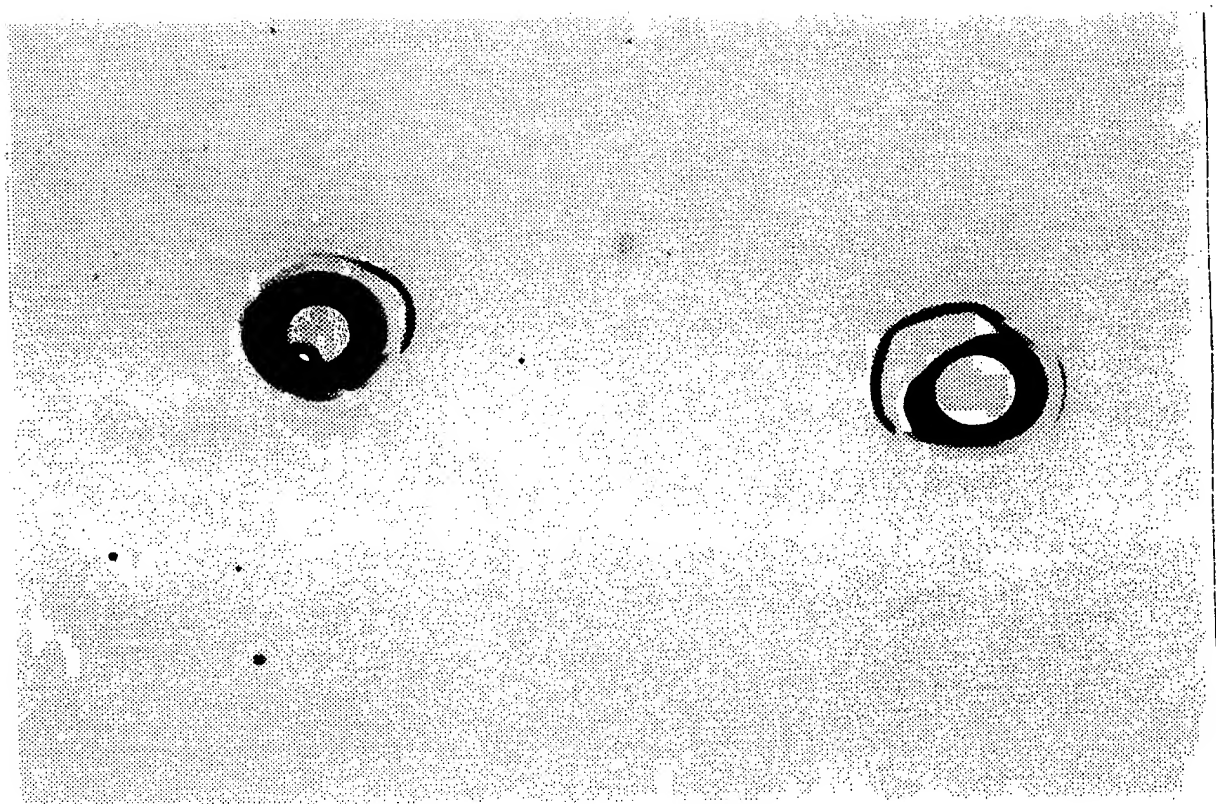


図 17



☒ 18

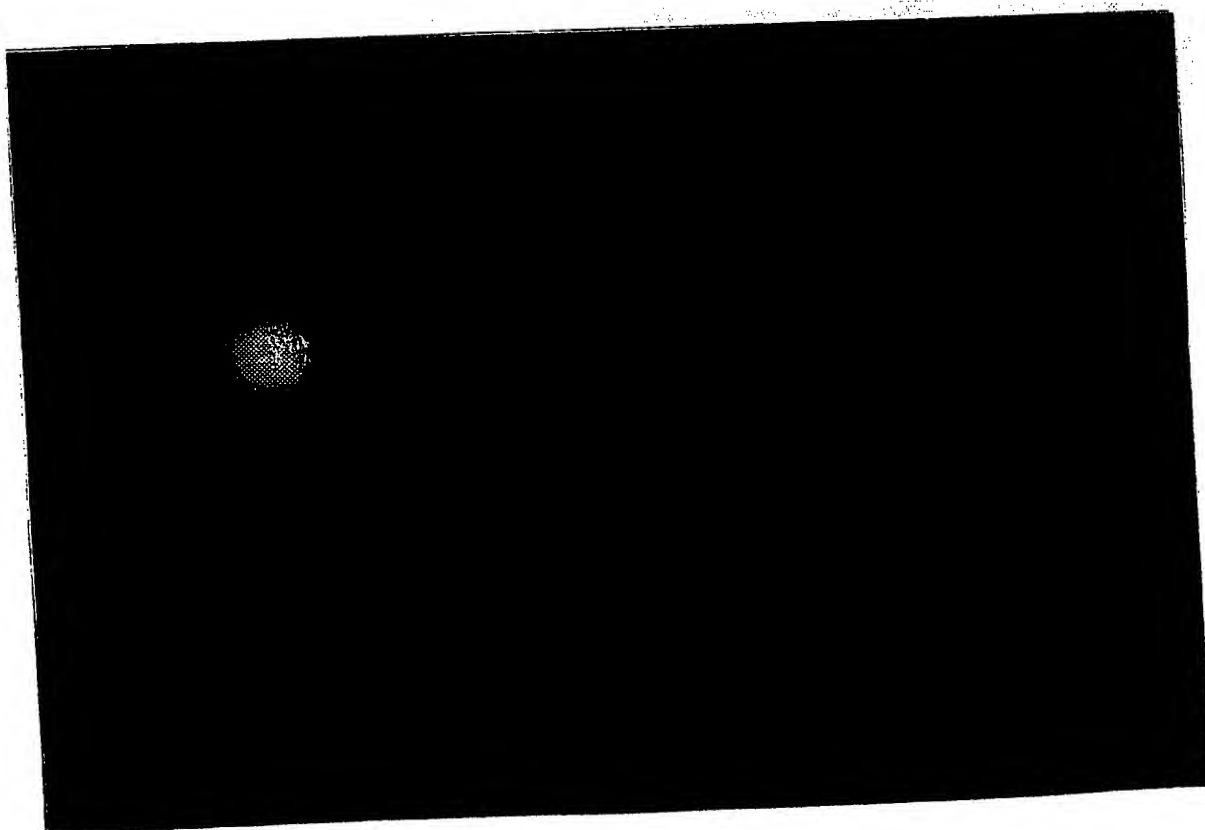


図 19

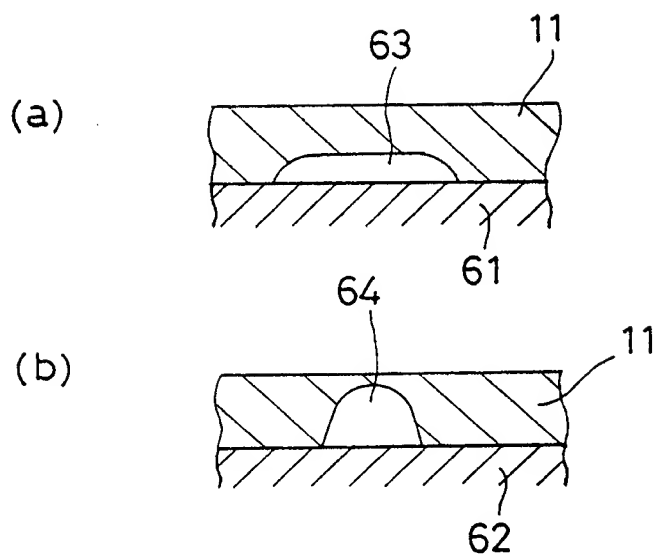


図 20

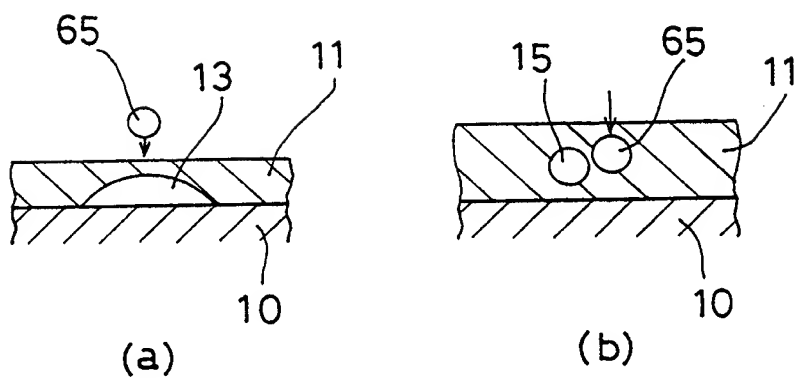


図 2 1

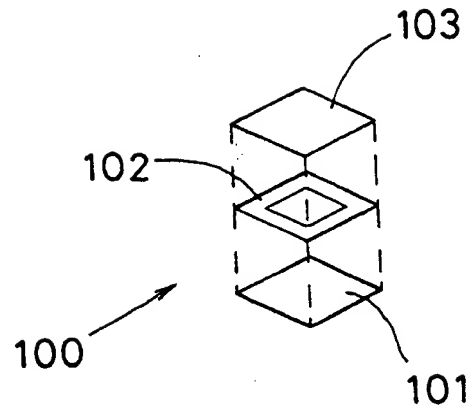


図 2 2

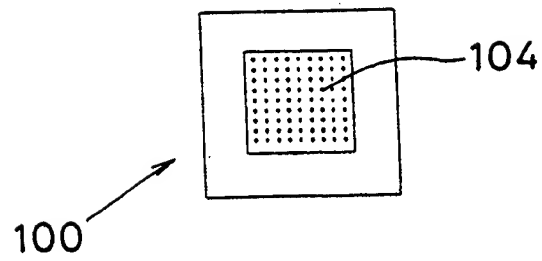


図 2 3

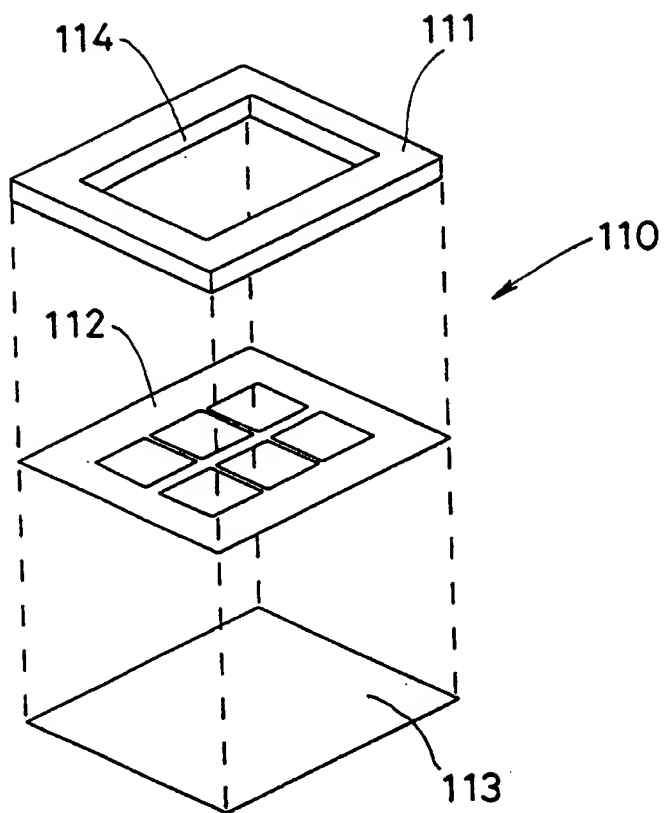


図 2 4

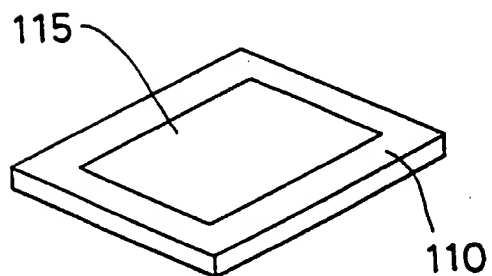


図 25

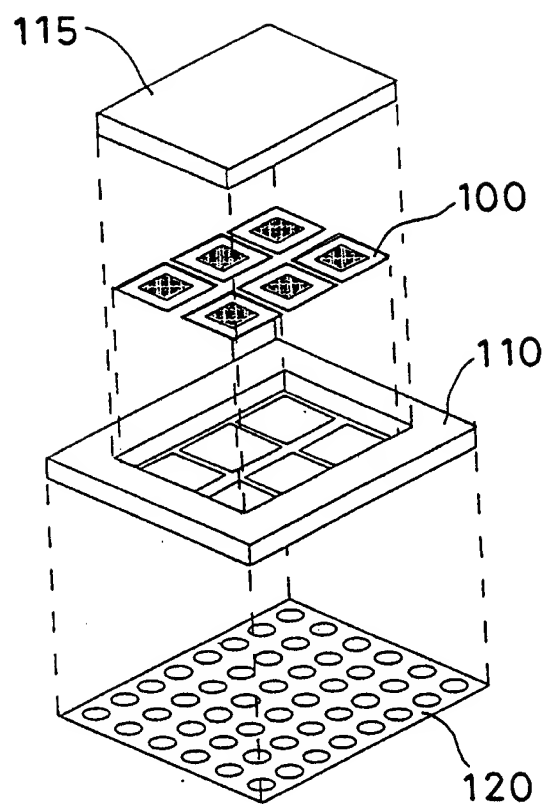




図 2 6

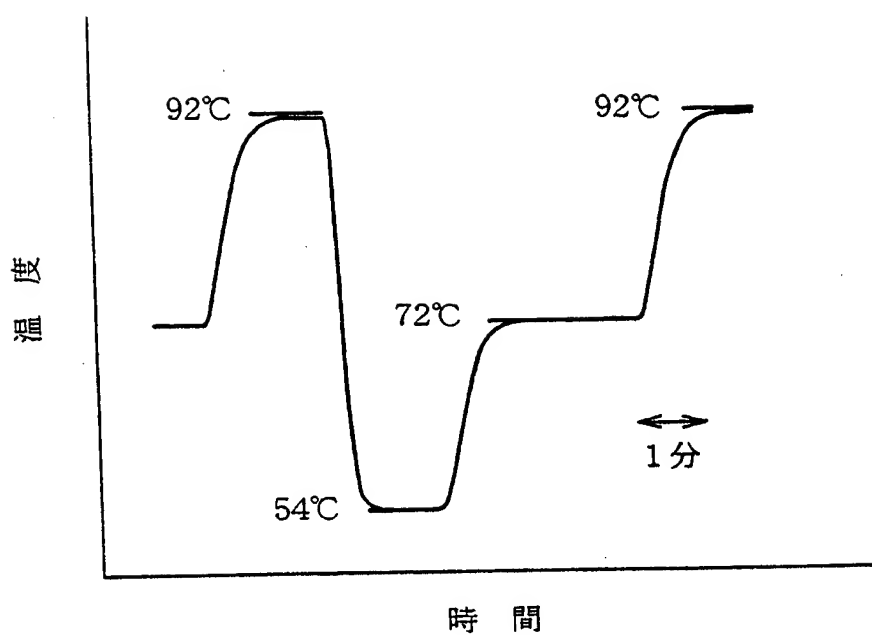


図 2 7

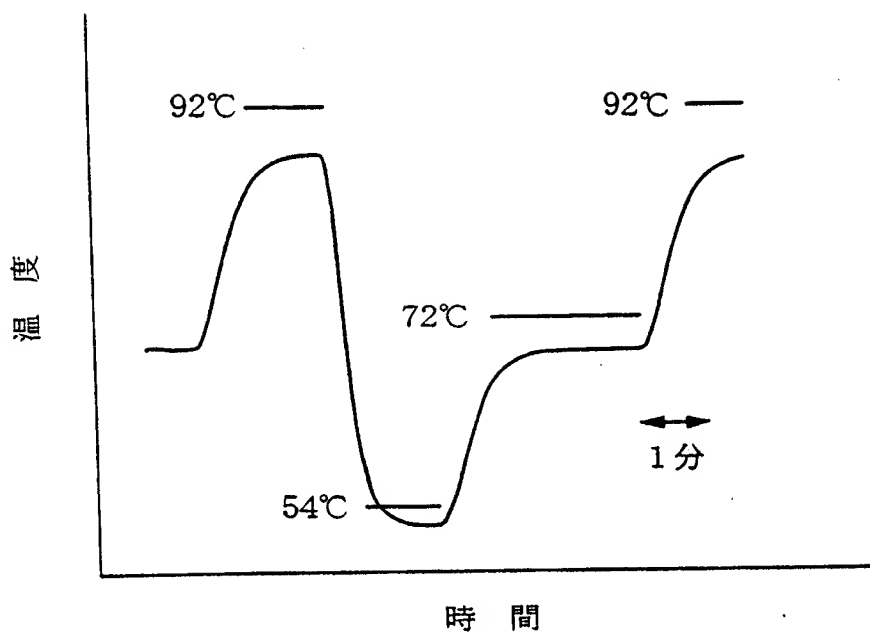


図 2 8

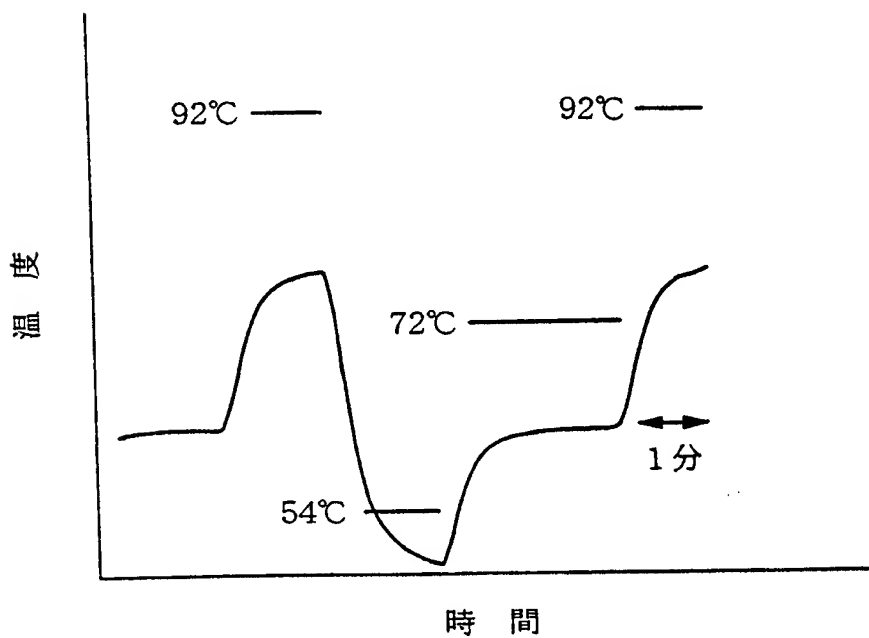


図 2 9

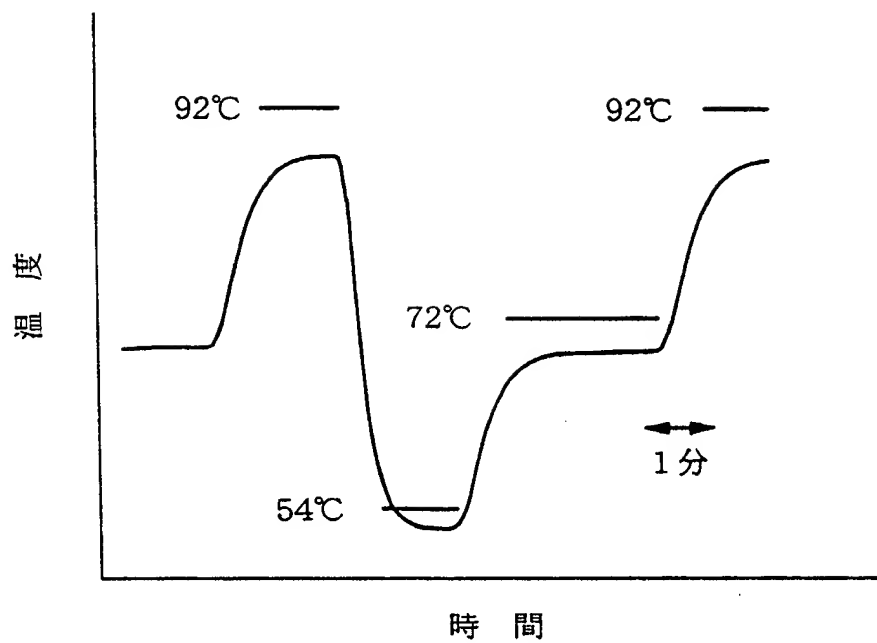


図 3 0

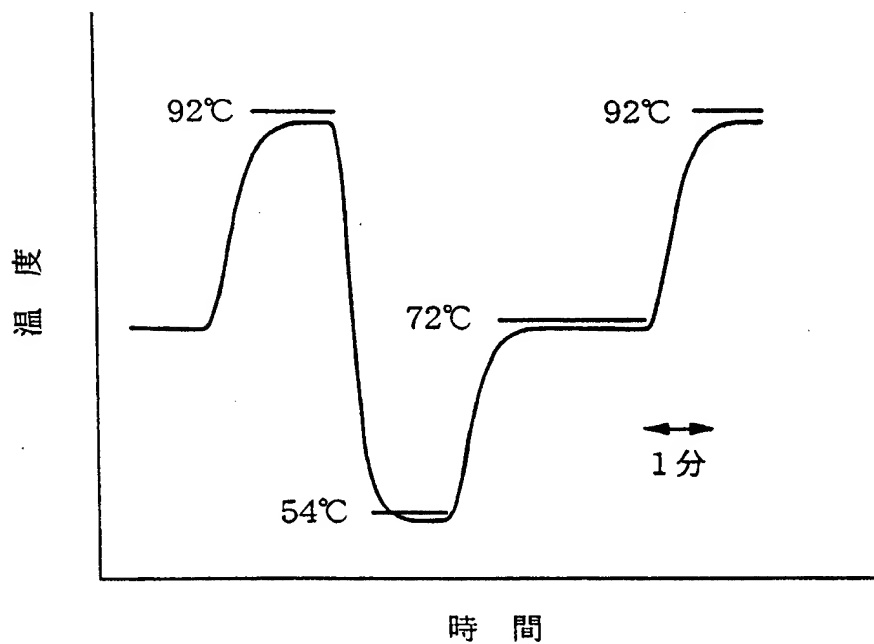


図 3 1

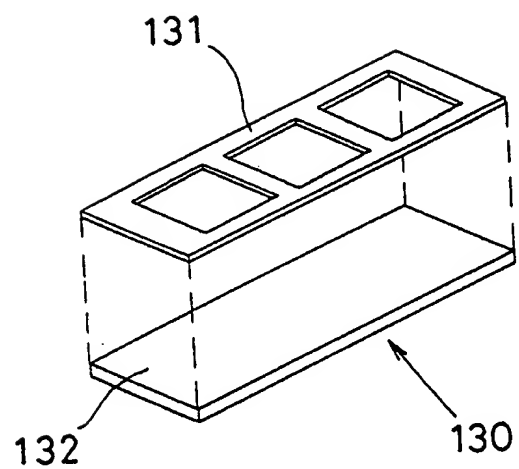


図 3 2

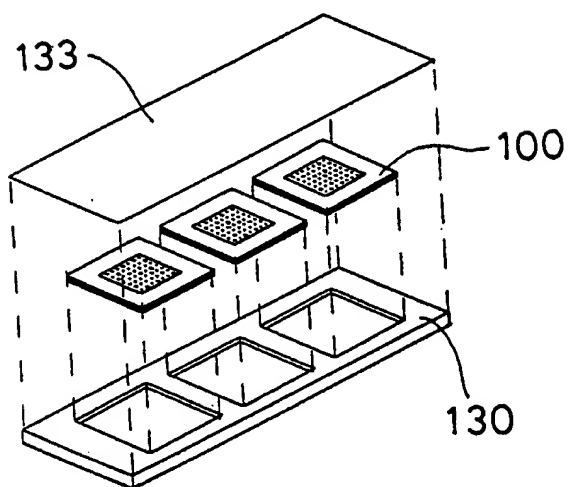


図 3 3

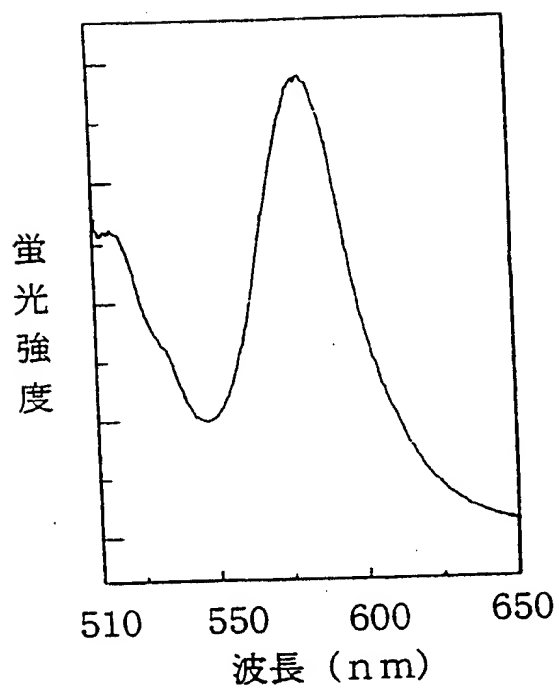


図 3 4

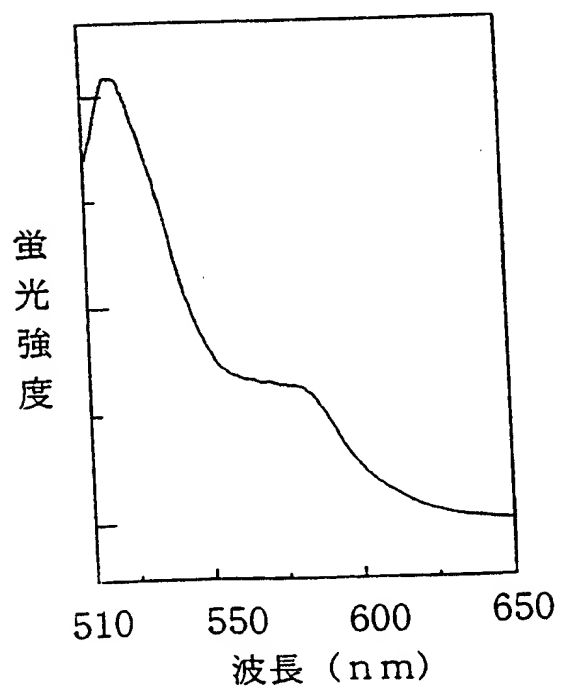


図 3 5

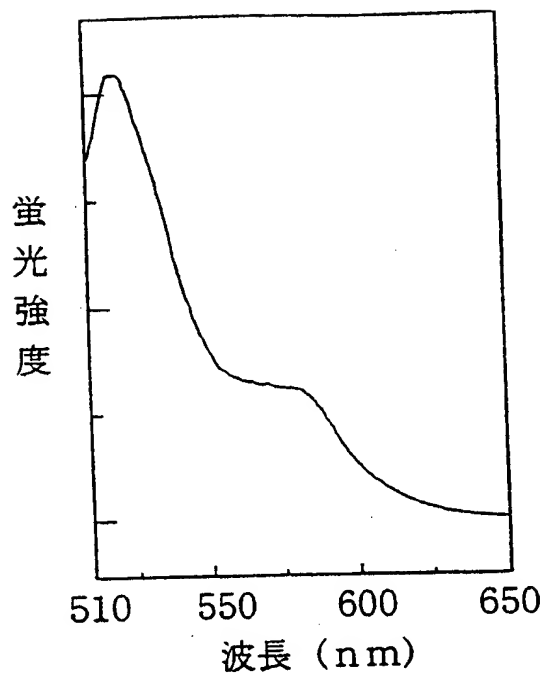


図 3 6

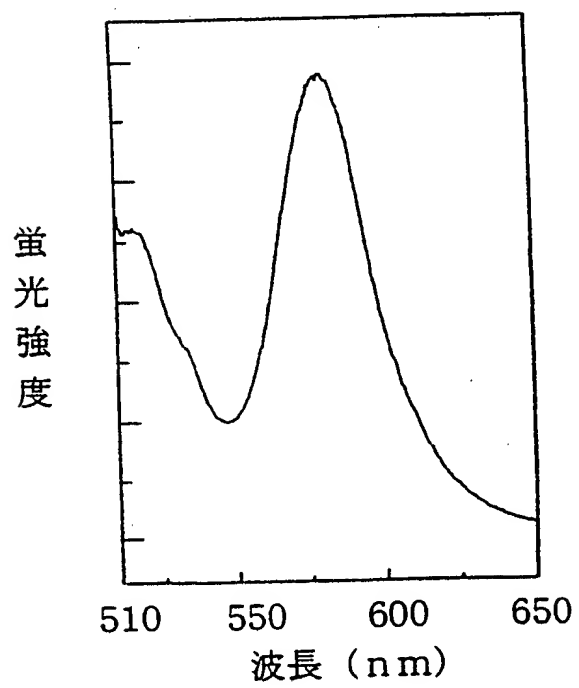


図 3 7

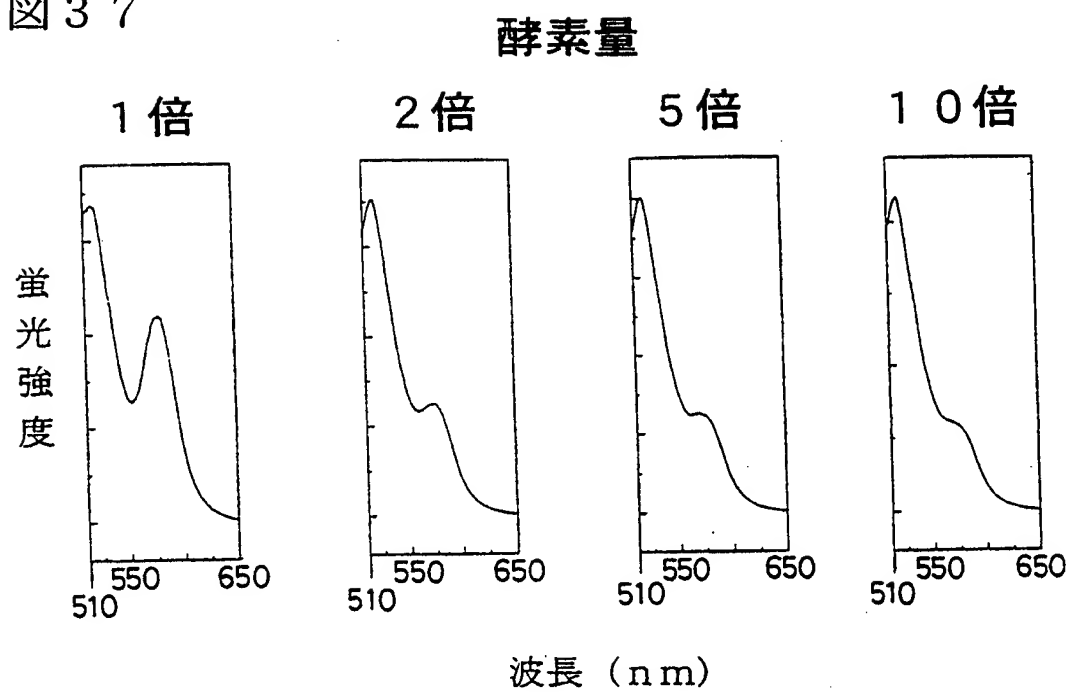


図 3 8

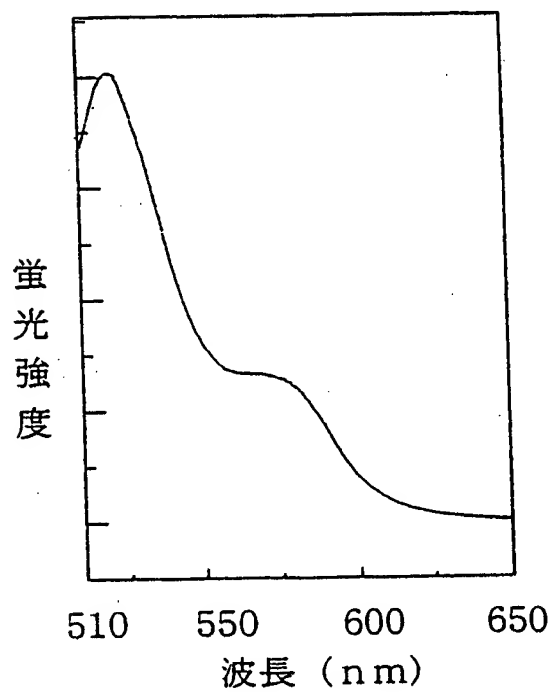


図 3 9

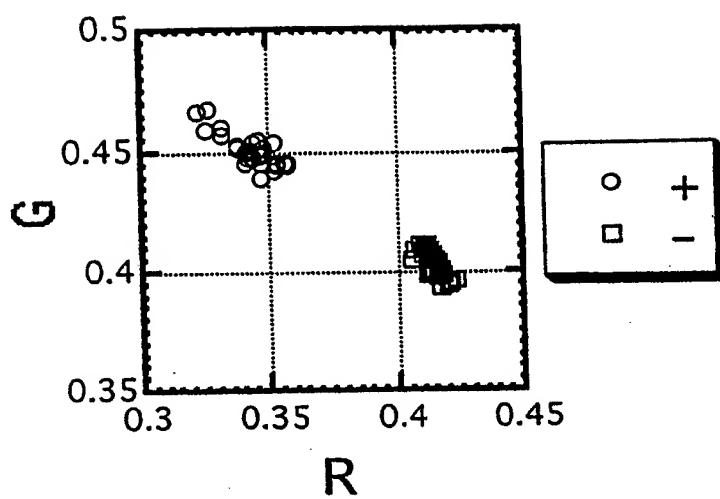


図 4 0

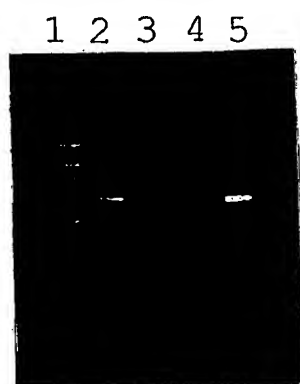




図 4 1

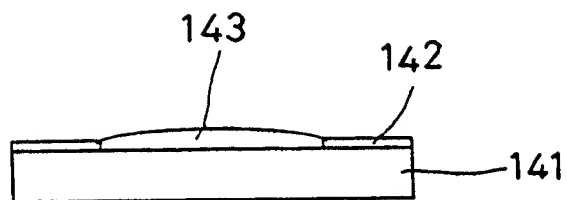
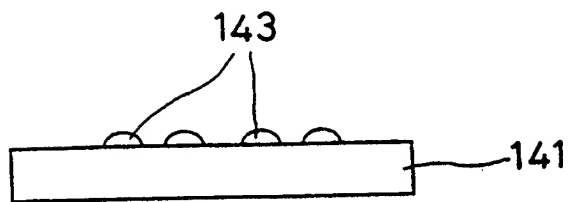


図 4 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/02389

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> G01N1/00, C12Q1/68, G01N33/48, C12M1/00, B01J19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1940-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 4-208836, A (Olympus Optical Co., Ltd.), July 30, 1992 (30. 07. 92), Full text ; Figs. 1 to 9	13 14-15
Y	JP, 6-3231, A (Toppan Printing Co., Ltd.), January 11, 1994 (11. 01. 94), Par. Nos. [0012], [0015], [0019]	13
Y	Par. Nos. [0002], [0004]	14
Y	JP, 9-105708, A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), April 22, 1997 (22. 04. 97), Par. Nos. [0014] to [0025]	13
A	JP, 8-233710, A (Hitachi, Ltd.), September 13, 1996 (13. 09. 96), Par. Nos. [0014] to [0026] ; Figs. 1 to 7	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
August 7, 1998 (07. 08. 98)

Date of mailing of the international search report  
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02389

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> G 0 1 N 1 / 0 0, C 1 2 Q 1 / 6 8, G 0 1 N 3 3 / 4 8, C 1 2 M 1 / 0 0, B 0 1 J 1 9 / 0 0

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> G 0 1 N 1 / 0 0, C 1 2 Q 1 / 6 8, G 0 1 N 3 3 / 4 8, C 1 2 M 1 / 0 0, B 0 1 J 1 9 / 0 0

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-1998年  
 日本国登録実用新案公報 1994-1998年  
 日本国実用新案登録公報 1996-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 4-208836, A (オリンパス光学工業株式会社) 30. 7月. 1992 (30. 07. 92) 全文, 第1-9図	13 14-15
Y	J P, 6-3231, A (凸版印刷株式会社) 11. 1月. 1994 (11. 01. 94) 段落番号【0012】, 【0015】, 【0019】	13
Y	段落番号【0002】, 【0004】	14
Y	J P, 9-105708, A (株式会社京都第一化学) 22. 4月. 1997 (22. 04. 97) 段落番号【0014】-【0025】	13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 08. 98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小山 茂 印

2 J

7519

電話番号 03-3581-1101 内線 3261

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-233710, A (株式会社日立製作所) 13. 9月. 1996 (13. 09. 96) 段落番号【0014】 - 【0026】 及び第1-7図	1-15